

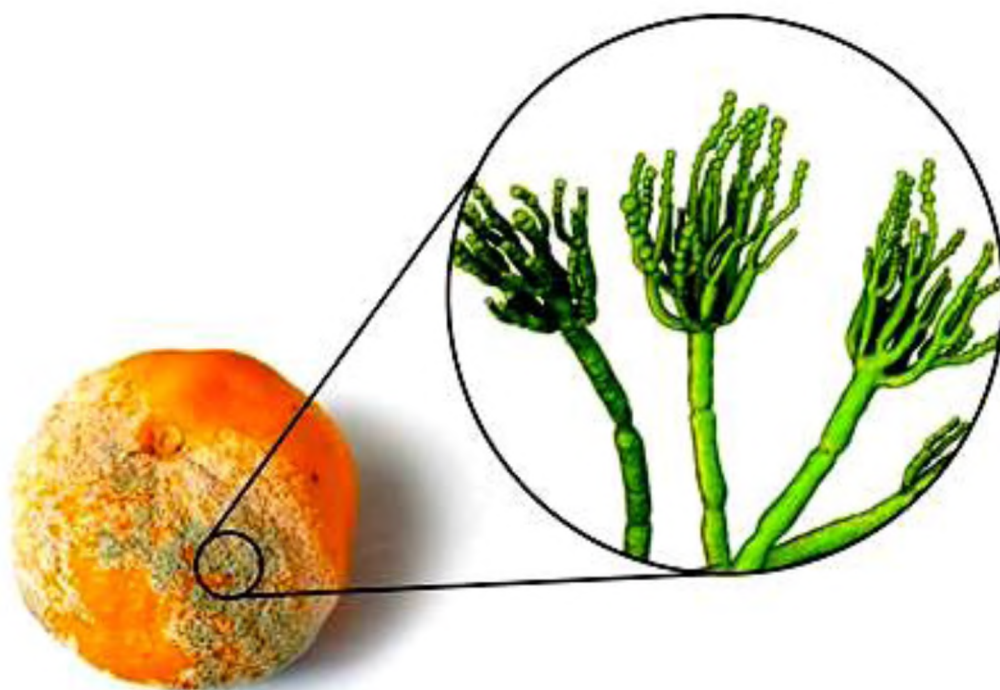
МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Кафедра микробиологии и вирусологии

МИКОЛОГИЯ С МИКОТОКСИКОЛОГИЕЙ. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОТОКСИКОЗОВ

Учебно-методическое пособие
для студентов по специальности «Ветеринарная медицина»



Витебск
ВГАВМ
2023

УДК 619:616.992.28-076
ББК 48.735
М59

Рекомендовано к изданию
методической комиссией факультета ветеринарной медицины
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины»
от 21.03.2023 г. (протокол № 3)

Авторы:

магистр ветеринарных наук, старший преподаватель *А. Г. Кошнеров*;
доктор ветеринарных наук, профессор *И. А. Красочко*; кандидат
ветеринарных наук, доцент *Е. А. Кирпанёва*; кандидат ветеринарных на-
ук, доцент *С. В. Даровских*; кандидат ветеринарных наук, доцент
Ю. А. Столярова; магистр ветеринарных наук, ассистент
И. Ю. Воробьёва; магистр ветеринарных наук, ассистент *Ю. О. Асташёнок*

Рецензенты:

кандидат ветеринарных наук, доцент *Н. Г. Толкач*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *С. В. Петровский*

М59 Микология с микотоксикологией. Лабораторная диагностика микотоксикозов : учеб.-метод. пособие для студентов по специальности «Ветеринарная медицина» / А. Г. Кошнеров [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2023. – 88 с.

Пособие написано в соответствии с программой дисциплины «Микология и микотоксикология». В пособии изложены методы лабораторной диагностики микотоксикозов сельскохозяйственных животных и птицы, а также культуральные и морфологические свойства отдельных токсикогенных грибов.

Пособие предназначено для студентов по специальности 1-74 03 02 (7-07-0841-01) «Ветеринарная медицина», а также может быть использовано в качестве дополнительной литературы для слушателей факультета повышения квалификации и переподготовки кадров, магистрантов, аспирантов.

УДК 619:616.992.28-076
ББК 48.735

© УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной
медицины», 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ПОРЯДОК ОТБОРА ПРОБ, ОФОРМЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КОРМОВЫХ СРЕДСТВ, НАПРАВЛЯЕМЫХ НА ИССЛЕДОВАНИЕ	6
2. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРМОВ	8
3. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КОРМОВ	10
4. ТОКСИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРМОВ	11
4.1. Экспресс-методы определения общей токсичности кормов	12
4.1.1. Определение токсичности кормов биотестированием на инфузориях <i>Stylonychia mytilus</i>	15
4.1.2. Определение токсичности кормов биотестированием на инфузориях <i>Colpoda steinii</i>	19
4.1.3. Определение токсичности кормов биотестированием на инфузориях <i>Tetrahymena pyriformis</i>	21
4.2. Основные методы определения общей токсичности кормов	24
4.2.1. Определение токсичности кормов биопробой на кроликах	25
4.2.2. Определение общей токсичности кормов в опыте на мышах	27
4.3. Определение токсичности кормов на сельскохозяйственных животных	29
5. МИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРМОВ	30
5.1. Выявление фитопатогенных грибов, развивающихся только в период вегетации злаков	30
5.2. Выявление токсикогенных грибов, способных развиваться в период хранения корма	35
5.2.1. Первичное выделение грибов из кормов	35
5.2.2. Выделение грибов в чистые культуры и их идентификация	38
6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ КУЛЬТУР ГРИБОВ	41
6.1. Определение токсичности культур грибов на простейших <i>Paramecium caudatum</i>	41
6.2. Определение токсичности культур грибов методом кожной пробы на кролике	44
7. ИНДИКАЦИЯ МИКОТОКСИНОВ В КОРМАХ	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	51
ПРИЛОЖЕНИЯ	54

ВВЕДЕНИЕ

Микотоксикология – это отрасль микологии, которая занимается анализом и изучением токсинов, выделяемых грибами (микотоксинов).

В настоящее время известно около 400 микотоксинов. Эти соединения в естественных условиях встречаются в кормах и пищевых продуктах. Микотоксины вырабатываются различными штаммами грибов, при этом каждый штамм может продуцировать несколько микотоксинов.

Грибы-продуценты микотоксинов можно разделить на 2 группы:

- полевые грибы – грибы-паразиты, которые поражают живые растения, чаще злаки в период вегетации (*Fusarium*, *Slafractonia*, *Phomopsis*, *Stenocarpella* и др.), обычно вырабатывают микотоксины в поле (до уборки урожая);
- грибы хранения – грибы-сапротрофы, которые размножаются на мертвых растениях и кормах (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Dendrodochium*, *Stachybotrys*, *Pithomyces* и др.), обычно появляются после уборки урожая.

Высокая опасность микотоксинов выражается в том, что они обладают токсическим эффектом в чрезвычайно малых количествах и способны достаточно интенсивно диффундировать вглубь продукта. Потенциальная и реальная опасность микотоксинов значительно усиливается ввиду их высокой стабильности к различным неблагоприятным воздействиям, таким как кипячение, обработка минеральными кислотами, щелочами и другими агентами.

Микотоксикозы – алиментарные токсикозы, развивающиеся у сельскохозяйственных животных после скармливания им кормов (у людей – употребления пищевых продуктов), загрязненных токсичными экзометаболитами, продуцируемыми микроскопическими грибами.

В большинстве случаев источником отравления служат корма или пищевые продукты, пораженные плесневыми или дрожжевыми грибами. Эти грибы, развиваясь на питательном субстрате, выделяют в него целый ряд соединений, часть из которых является терминальными продуктами обмена, часть – аллопатическими агентами, признанными помешать колонизации субстрата видами-конкурентами. Поскольку метаболизм у грибов и животных достаточно сходен, вещества, призванные «отпугнуть» другие грибы, часто оказываются ядовитыми для человека и животных.

В отличие от микозов микотоксикозы – неинфекционные заболевания с характерными признаками: внезапность и массовость возникновения, короткий инкубационный период, отсутствие контагиозности.

Основой профилактики микотоксикозов сельскохозяйственных животных должны быть комплексные мероприятия, направленные на предотвращение или сведение к минимуму уровней микотоксинов в кормах на всех этапах их приготовления, транспортировки, хранения и использования.

Одним из направлений комплекса мер по профилактике микотоксикозов является недопущение скармливания животным кормов, загрязненных мико-

токсинами в концентрациях, способных вызывать заболевание или отрицательно повлиять на их продуктивность, состояние здоровья, потомство, качество получаемой продукции. С этой целью важное значение приобретают профилактические микотоксикологические исследования кормов, заготовленных как внутри хозяйства, так и поступающих из других хозяйств или кормопроизводящих предприятий, а также диагностические микотоксикологические исследования кормов и патологического материала при возникновении микотоксикоза у отдельных животных.

1. ПОРЯДОК ОТБОРА ПРОБ, ОФОРМЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КОРМОВЫХ СРЕДСТВ, НАПРАВЛЯЕМЫХ НА ИССЛЕДОВАНИЕ

При обнаружении у животных признаков микотоксикоза из рационов исключают корма, подозреваемые в недоброкачественности. Для исследования высылают в ветеринарную лабораторию пробы всех кормов, входивших в суточный рацион в течение 1 месяца до проявления болезни, и остатки кормов в кормушках (грубые корма отбирают из пораженных участков партии).

Для пересылки и хранения пробы кормов с повышенной влажностью досушивают при температуре +40...45°C до влажности, предусмотренной соответствующими ТНПА.

Отбор средних проб кормов проводят в соответствии с действующими ТНПА с участием ветеринарных и зоотехнических специалистов и представителей администрации предприятий, хозяйств:

- зерна фуражного – по ГОСТ 13586.3-2015 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб»;
- комбикормов, кормовых дрожжей – по ГОСТ 13496.0-2016 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб»;
- муки и отрубей – по ГОСТ 27668-88 «Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб»;
- жмыхов, шротов – по ГОСТ 13979.0-86 «Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб»;
- семян масличных культур – по ГОСТ 10852-86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб»;
- грубых кормов (сено, солома) – по ГОСТ 4808-87 «Сено. Технические условия»;
- муки кормовой рыбной – по ГОСТ 31339-2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб»;
- муки кормовой животного происхождения – по ГОСТ 17681-82 «Мука животного происхождения. Методы испытаний».

Средние пробы других видов кормовых средств отбирают в соответствии с ГОСТ 12430-2019 «Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях».

Отобранную среднюю пробу разделяют на 2 части массой не менее 1 кг каждая, упаковывают в чистые сухие банки или хлопчатобумажные мешки и опечатывают. Одну часть пробы направляют для исследований с актом комиссионного отбора и сопроводительным документом, вторую часть пробы хранят в хозяйстве в течение 1 месяца в условиях, предотвращающих порчу или вторичное загрязнение.

В сопроводительном документе указывают цель исследования, вид кормового средства, его назначение, массу партии, место отбора пробы; для комбикормов, кроме того, номер и состав рецепта (в случае отклонения от него при-

лагают копию качественного удостоверения), наименование предприятия-изготовителя, дату выработки продукции, обозначение ТНПА на нее, номер смены, номер партии.

При диагностических исследованиях дополнительно указывают дату возникновения заболевания, вид и количество заболевших животных, основные клинические признаки заболевания. В случае падежа животных к сопроводительному документу прилагается копия акта вскрытия с подробным описанием установленных патологоанатомических изменений, а также копия экспертиз ветеринарной лаборатории об исключении инфекционных болезней и отравлений животных химическими и растительными ядами, если такие исследования к указанному моменту проведены.

2. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРМОВ

Органолептический анализ кормов проводят в соответствии с действующими ТНПА:

- зерна – по ГОСТ 10967-2019 «Зерно. Методы определения запаха и цвета»;
- комбикормов – по ГОСТ 13496.13-2018 «Комбикорма. Методы определения запаха, зараженности вредителями хлебных запасов»;
- сена и соломы – по ГОСТ 4808-87 «Сено. Технические условия»;
- жмыхов и шротов – по ГОСТ 13979.4-68 «Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Методы определения цвета, запаха, количества темных включений и мелочи»;
- семян масличных культур – по ГОСТ 10854-2015 «Семена масличные. Методы определения сорной, масличной и особо учитываемой примеси»;
- кормовых дрожжей – по ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия».

Сущность анализа заключается в органолептическом определении цвета и запаха кормов при помощи органов чувств.

На грубых кормах при развитии грибов могут быть выявлены следующие признаки: потемнение, побурение, грибной налет различного цвета (черный, белый, сероватый и др.), слежавшиеся пласты.

Гриб *Stachybotrys alternans* на соломе образует сплошной или только на узлах, черный, сажистый налет.

Зерновые корма (ячмень, овес, пшеница и др.), пораженные грибами рода *Fusarium*, могут содержать легковесные, щуплые зерна с матово-серой оболочкой, иногда на оболочке, часто в области зародыша, заметны пятна или коростинки с карминно-красной или розово-оранжевой окраской, представляющие собой грибницу или спороношение гриба; такую же окраску можно обнаружить и у эндосперма при надломе зерна.

При развитии грибов *Aspergillus* и *Penicillium* зерна могут иметь потемневшие зародыши, а также плесневый налет зеленых, серых, голубоватых оттенков.

При органолептическом анализе грубых кормов и зерна обращают внимание на наличие головни (*Ustilago spp.*) и спорыньи (*Claviceps purpurea*), паразитирующих на злаках в период их вегетации.

Запах определяется как в целом, так и в размолотом зерне. Для усиления запаха зерно помещают в стакан и заливают горячей водой (температурой +60...+70°C), затем покрывают стеклом и через 2-3 минуты определяют запах. Для усиления запаха зерно можно прогревать паром в течение 2-3 минут в сетке над кипящей водой.

При поступлении на исследование дефектного или подвергнувшегося самосогреванию зерна определяют степень его порчи. По органолептическим показателям различают 4 степени дефектности зерна (таблица 1).

Таблица 1 – Органолептические признаки зерна, пораженного токсикогенными грибами

Степень дефектности зерна	Запах зерна	Внешние покровы зерна	Эндосперм и зародыш зерна
1-я	Солодовый	Цвет внешних покровов зерна без изменений	Эндосперм с нормальным оттенком
2-я	Плеснево-затхлый	Внешний покров зерен без блеска, потемневший	Эндосперм и зародыш могут быть темными
3-я	Плеснево-гнилостный	Цвет внешних покровов зерна темный	Эндосперм кремовый, поражен зародыш
4-я	Гнилостный	Цвет внешних покровов зерна темный	Эндосперм коричневый

Зернофураж 1-й и 2-й степени дефектности подвергают дальнейшему санитарно-микологическому исследованию с целью определения его пригодности к скармливанию животным.

Считаются недоброкачественными и непригодными к использованию:

- непрессованное сено или солома, пораженные грибами более чем на 10% (горелое, заплесневелое, с затхлым запахом); прессованное – содержащее более 10% кип с прослойками заплесневелой соломы (сена) с затхлым запахом;
- комбинированные корма, отруби, дрожжи кормовые, мучка кормовая, жмыхи, шроты, мука кормовая рыбная, мука кормовая животного происхождения, имеющие затхлый, плесневый, гнилостный и другие запахи, не свойственные данным продуктам, а также комковатость и устанавливаемое визуально заплесневение;
- зерно фуражное 3-й и 4-й степени дефектности.

Корма, признанные непригодными к использованию по результатам органолептического анализа, дальнейшему исследованию не подлежат; при подозрении на отравление животных такие корма подвергают токсико-биологическому анализу.

3. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КОРМОВ

Люминесцентным методом подвергают экспертизе зернофураж (ячмень, овес, пшеница, кукуруза).

Метод люминесцентного анализа кормов применяется с целью:

- выявления степени пораженности кормов различными грибами;
- отбора пораженных зерен для микологического исследования.

С указанной целью в бактериологические чашки насыпают сухой корм и исследуют под ртутно-кварцевой лампой или в люминоскопе марки «Филин» или др.

В зависимости от степени заспорения или глубины поражения зерна яркость флюоресценции его варьирует:

- сильное заспорение или развитие грибов на эпидермисе зерна (наружный слой) обуславливают тускло-фиолетовое свечение различной интенсивности; размол такого зерна дает яркое сиреневое или сиренево-фиолетовое свечение;
- зерно с поражением всех его оболочек (мезокарпия, эндокарпия, алейронового слоя) не люминесцирует; крупный размол зерна с пораженными оболочками частично флюоресцирует ярко-сиреневым светом;
- проникновение грибов в мучнистое ядро (эндосперм) тушит люминесценцию как цельного зерна, так и его размола;
- зерно, подвергавшееся физико-химическому воздействию, не люминесцирует или слабо люминесцирует (наблюдается тусклое его свечение);
- наличие в муке частиц спорыньи (*Claviceps purpurea*) обнаруживается вследствие темно-оранжевого свечения их.



«Филин»



«Сова»



«Орион»

Рисунок 1 – Люминоскопы

4. ТОКСИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРМОВ

Определение общей токсичности кормов (фуражного зерна (пшеница, кукуруза, овес, ячмень) и продуктов его переработки (мука, крупа, отруби, лузга, жмыхи, шроты), растительных кормов (сено, солома, травяная мука), комбикормов для продуктивных и непродуктивных животных (в том числе консервов) и сырья для их производства (корма животного происхождения, продукты микробиологического синтеза, сухое молоко, концентрированные кормовые добавки) осуществляется в соответствии с ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» экспресс-методами и основными методами.

Схема определения общей токсичности кормов представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Схема определения общей токсичности кормов

В случаях, если токсичность корма не выявлена вышеперечисленными методами, для установления роли кормов в возникновении заболеваний невыясненной этиологии можно применять скармливание подозрительных кормов тем видам животных, которые болели в хозяйстве.

4.1. Экспресс-методы определения общей токсичности кормов

Экспресс-методы (ускоренные и предварительные) позволяют в течение времени от 1,5 до 3 часов провести биотестирование кормов на инфузориях: стилонихиях, колподах, парамециях и тетрахименах.

Применение инфузорий для проведения биологического тестирования можно объяснить наиболее быстрым развитием тест-реакции в ответ на воздействие химических веществ. У инфузорий реакции организма на внешнее воздействие осуществляются на клеточном уровне. Поскольку инфузории не имеют хитиновой оболочки, норма реакции на внешние воздействия довольно высока (наступление таких реакций может происходить в диапазоне от нескольких минут до нескольких часов). Кроме того, она удобна для проведения визуального метода, не требует больших экономических затрат при культивировании и обладает высокой чувствительностью. Короткий жизненный цикл, быстрота размножения инфузорий позволяют проследить реакцию на интоксикацию в относительно короткий срок в длинном ряду поколений. Используя принцип клонирования, можно получить большое количество генетически однородного материала.

Применение биологического тестирования имеет ряд преимуществ перед физико-химическим анализом, средствами которого часто не удается обнаружить неустойчивые соединения или количественно определить ультрамалые концентрации химических веществ. Довольно часты случаи, когда выполненный современными средствами химический анализ не показывает наличия токсикантов, тогда как использование биологических тест-объектов свидетельствует об их присутствии в исследуемой среде.

Подготовка к проведению испытаний. Для изготовления блока луночных микроаквариумов (рисунок 3) используют пластины органического стекла с размерами $15 \times 8,5 \times 1,3$ см. В пластине высверливают с последующей полировкой 5 рядов по 9 лунок. Диаметр каждой лунки – 1,2 см верхний и 0,8 см нижний, глубина – 0,7 см. Рабочий объем каждой лунки – $0,4 \text{ см}^3$. Вместо блока микроаквариумов можно использовать микробиологические предметные стекла с отшлифованной лункой вместимостью $0,2 \text{ см}^3$ (по 5 шт. на пробу).

Вся посуда и блоки микроаквариумов, необходимые для биотестирования, должны быть химически чистыми и использоваться только для данного анализа. В качестве моющего средства допускается к применению только хозяйственное мыло и мыльный раствор.

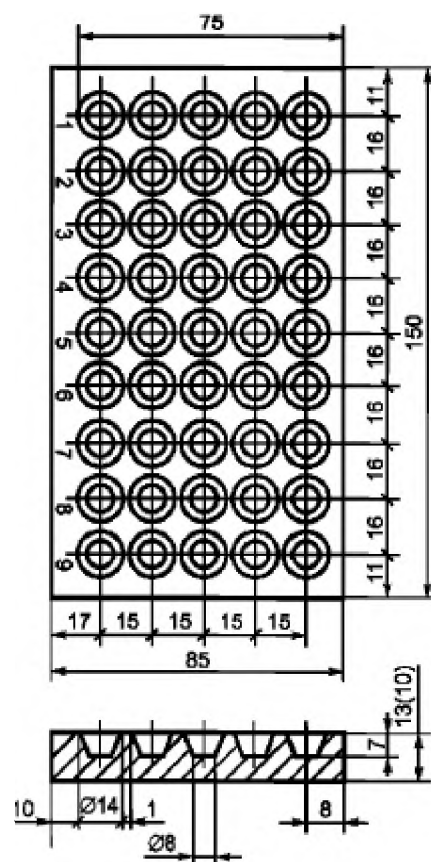


Рисунок 3 – Блок луночных микроаквариумов [ГОСТ 31674-2012]

Чашки Петри и колбы для приготовления раствора Лозина-Лозинского прокаливают в сушильном шкафу в течение 2 часов при температуре +120...+150°C. Блоки из органического стекла сушат только на воздухе.

Дистилляцию воды для биотестирования необходимо проводить в химически чистом помещении.

Средой для культивирования инфузорий *Stylonychia mytilus* и *Colpoda steinii* и разбавления ацетоновых экстрактов кормов служит раствор Лозина-Лозинского следующего состава: NaCl – 0,01%-ный; KCl – 0,001%-ный; 2-водный CaCl₂ – 0,001%-ный; 6-водный MgCl₂ – 0,001%-ный; NaHCO₃ – 0,002%-ный.

Для удобства сначала готовят 10-кратный концентрированный раствор: в дистиллированной воде растворяют 1,0 г хлористого натрия, 0,1 г хлористого калия, 0,1 г 7-водного хлористого магния, 0,1 г 2-водного хлористого кальция, 0,2 г кислого углекислого натрия и доводят объем до 1 дм³ (полученный раствор хранят не более 1 месяца в холодильнике в стерильной колбе под ватно-марлевой пробкой).

Рабочий раствор Лозина-Лозинского готовят путем разбавления в 10 раз (1:9) концентрированной среды дистиллированной водой (рабочий раствор хранят не более 14 суток при комнатной температуре).

Для приготовления модельного токсиканта берут 10 мг 5-водной сернокислой меди, растворяют ее в дистиллированной воде и доводят объем до 1 дм³ (срок хранения раствора модельного токсиканта – не более 7 суток в холодильнике в стерильной колбе).

Рабочие концентрации модельного токсиканта готовят последовательным 10-кратным его разбавлением в день проведения анализа. Сначала до концентрации 1 мг/дм³ раствор разбавляют дистиллированной водой, а затем до концентрации 0,1 мг/дм³ – раствором Лозина-Лозинского.

Рабочая концентрация – 0,1 мг/дм³. Рабочий раствор используют только свежеприготовленным.

Для приготовления водного раствора ацетонового экстракта пробу исследуемого корма массой 10±0,1 г помещают в пробирку с пришлифованной пробкой вместимостью 25 см³ или в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 или 100 см³ и заливают определенным количеством ацетона в зависимости от вида исследуемого корма.

Для получения ацетонового экстракта пробирку или колбу энергично встряхивают не менее 2 минут, а затем отстаивают в течение не менее 10 минут и не более 15 минут.

При высокой набухаемости (гигроскопичности) исследуемого корма допускается увеличивать количество ацетона на 5-10 см³ таким образом, чтобы толщина слоя ацетона над кормом была не менее 2 мм. Раствор вновь взбалтывают в течение 2 минут. После повторного отстаивания в течение 10 минут осторожно отбирают автоматической пипеткой или шприцем с длинной иглой 0,5 см³ полученной надосадочной жидкости экстрактов и переносят ее в химический стакан или колбу с водным раствором Лозина-Лозинского.

Все параметры приготовления водного раствора ацетонового экстракта в зависимости от вида исследуемого корма представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Приготовление водного раствора ацетонового экстракта

Вид испытываемого корма	Навеска корма, г	Количество ацетона, см ³	Приготовление водного раствора ацетонового экстракта	
			ацетоновый экстракт, см ³	рабочий раствор Лозина-Лозинского, см ³
Комбикорма для рыб	10	14	0,5	50
Комбикорма для сельскохозяйственных животных, птиц и непродуктивных животных, в том числе консервы	10	15	0,5	40
Зернофураж: ячмень, овес, пшеница, кукуруза, отруби, лузга	10	15	0,5	40
Шроты, жмыхи	10	15	0,5	40
Мука пшеничная, крупа	10	15	0,5	40
Мука травяная	10	20	0,5	40
Мука рыбная, крилевая	10	10	0,5	80
Мука костная, мясокостная, мясная, перьевая	10	10	0,5	30
Мука кровяная	10	15	0,5	80
Молоко сухое	10	15	0,5	80
Дрожжи кормовые, гидролизные	10	15	0,5	50
Сено, солома	10	20	0,5	50

Остальные концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки (белкововитаминные комплексы, премиксы, минеральные и витаминные добавки) анализируют по схеме биотестирования комбикормов (рисунок 2). Предварительно такие добавки вносят согласно рецептам или зоотехническим нормам в размолотую пробу проверенного биотестированием нетоксичного на 100% зерна пшеницы (наполнитель). Пробу пшеницы размалывают и тестируют в день проведения анализа и не хранят.

Для приготовления водного экстракта испытываемого корма пробу массой $10 \pm 0,1$ г вносят в колбу вместимостью 250 см³ и заливают 100 см³ дистиллированной воды. Колбы с содержимым встряхивают на аппарате в течение 20 минут, после чего смесь фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют с частотой вращения 1000 оборотов/минуту в течение 5 минут и отделяют надосадочную жидкость.

Культивирование и биотестирование проводят в отдельном помещении с естественным или искусственным освещением, изолированном от химических

токсичных реактивов (особенно от летучих соединений, хорошо растворимых в воде).

При подготовке и проведении испытаний должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды: +17...+27°C;
- относительная влажность: не более 80%.

4.1.1. Определение токсичности кормов биотестированием на инфузориях *Stylonychia mytilus*

Принцип метода. Метод основан на извлечении из исследуемых кормов различных фракций токсических веществ параллельно ацетоном и водой с последующим воздействием этих экстрактов на стилонихий.

Оценку результату биотеста дают по реакции гибели инфузорий. Безопасным в этом случае следует считать корм, определенный как нетоксичный при одновременном параллельном исследовании как ацетонового, так и водного экстракта.

С учетом времени подготовки пробы корма к биотесту определение общей токсичности 1 пробы занимает от 3,5 до 4 часов, а 10 проб – от 4,5 до 5 часов.

Простейшие *Stylonychia mytilus* (рисунок 4) относятся к царству *Chromista*, типу *Ciliophora* (реснитчатых инфузорий), классу *Hypotrichea*, отряду *Oxytrichida*, семейству *Oxytrichidae*. Это род инфузорий, которые обитают в придонном слое солоноватых и пресных водоемов, их можно найти на нитчатых водорослях, поверхностных пленках и среди частиц донных отложений. Тело (длиной 100-300 мкм) продолговато-овальное, покрыто видоизмененными щетинками: на спинке короткие чувствительные щетинки, на брюшке они сливаются в пучки, так называемые усики, с помощью которых стилонихии передвигаются. Питаются бактериями, водорослями, мелкими жгутиконосцами, инфузориями. Размножение бесполое (деление пополам) и половое (конъюгация).



Рисунок 4 – *Stylonychia mytilus*
[live.staticflickr.com]

Подготовка к испытанию. Для приготовления корма для стилонихий свежие хлебопекарные дрожжи предварительно тестируют на общую токсичность. Затем навеску массой 50 г измельчают и высушивают в сушильном шкафу при температуре +50...+55°C в течение 2 суток (хранят готовые дрожжи в стерильной банке с притертой крышкой в сухом прохладном месте не более 12 месяцев, избегая попадания прямых солнечных лучей и насыщения дрожжей атмосферной влагой).

Культивирование стилонихий и тестирование кормов проводят в отдельном помещении, изолированном от химических токсичных реактивов (особенно от летучих соединений, хорошо растворимых в воде). В стерильную чашку Петри вносят 25 см³ рабочего раствора Лозина-Лозинского, затем пипеткой переносят в нее массу стилонихий. При этом кончик пипетки, заполненный культурой стилонихии, нужно предварительно погрузить в чашку Петри с рабочим раствором Лозина-Лозинского. Туда же в качестве корма для стилонихий на кончике иглы, продезинфицированной 70%-ным раствором этилового спирта, вносят 0,003 г высушенных дрожжей (2-3 крошки диаметром 1-2 мм). Чашку Петри помещают в термостат для культивирования стилонихий при температуре +22...+24°C. Пересев культуры для хранения проводят 2 раза в неделю.

Допускается культивирование стилонихий вне термостата при температуре +18...+24°C. В этом случае для поддержания постоянной температуры используют лампу дневного света, установленную на определенном расстоянии от чашек Петри, обеспечивающем заданную температуру. Лампу вместе с чашками накрывают полиэтиленовой пленкой, создав подобие теплички, где температура должна быть постоянной. Во избежание попадания прямых солнечных лучей чашки Петри накрывают бумагой.

Необходимо учитывать, что культура стилонихий не обладает генетической стабильностью. Приблизительно через 12-18 месяцев работы с культурой она стареет, теряет однородность, жизнеспособность, подвижность, неадекватно реагирует на токсиканты. В этом случае необходимо 1 раз в год подсаживать свежий клон стилонихий к старой культуре или полностью заменять ее на новую. С целью замедления процесса вырождения культуры стилонихий при пересадке на свежую среду необходимо отбирать не только из предыдущей чашки Петри суточную культуру, но и из 2 резервных чашек Петри с 2-3-суточными культурами, в которых инфузории имеют наибольшую подвижность и плотность.

Для биотестирования используют только суточную культуру стилонихий, находящуюся в фазе экспоненциального (активного) роста. С этой целью за 1 сутки до анализа массу стилонихий пересаживают в новую питательную среду с кормом и помещают в термостат при оптимальной температуре +22...+24°C. При этом стилонихии активно размножаются и концентрируются вокруг корма.

Не допускается использовать культуру стилонихий, зараженную другими видами простейших, микроскопическими грибами или бактериями, что может произойти при использовании нестерильной посуды, плохо подсушенных или просроченных дрожжей.

Для получения достоверных результатов биотестирования необходимо регулярно проверять состояние стилонихий, их подвижность, а 1 раз в месяц – реакцию культуры на действие модельного токсиканта, для чего каплю со стилонихиями помещают в лунку предметного стекла и после подсчета их количества заливают 0,2 см³ раствора модельного токсиканта рабочей концентрации 0,1 мг/дм³. Через 30 минут подсчитывают количество оставшихся живыми стилонихий. Результат считают удовлетворительным, если выживают не менее 50% стилонихий.

Для подготовки исследуемого корма среднюю пробу исследуемого корма измельчают и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Проведение испытания. Каждую пробу корма исследуют 5 раз. Пересадку и подсчет стилонихий проводят под микроскопом при увеличении 2×8 или 2×14 .

Автоматической пипеткой с заменяемым наконечником отбирают по 20 мкл среды со стилонихиями и помещают в каждый из 5 микроаквариумов или лунок предметного стекла. Затем туда же автоматической пипеткой с чистым наконечником вносят по 20 мкл водного раствора ацетонового экстракта исследуемого корма, подготовленного для биотестирования, или водного экстракта исследуемого корма, подготовленного для биотестирования.

Через 2 минуты в каждом микроаквариуме или лунке подсчитывают количество стилонихий.

Оптимальное количество – от 10 до 20 шт., при этом травмированные клетки стилонихий (неподвижные, округлой формы) не учитывают.

После подсчета стилонихий в каждый микроаквариум или лунку другой автоматической пипеткой вносят по 200 мкл водного раствора ацетонового экстракта или водного экстракта исследуемого корма и отмечают время начала испытаний.

Перед каждым внесением раствора экстракта анализируемой пробы в микроаквариум или лунку наконечник пипетки вытирают ватой во избежание попадания в них жировых загрязнений с наружной стороны пипетки.

Через 1 час экспозиции при анализе водного раствора ацетонового экстракта испытуемого корма или через 3 часа при анализе водного экстракта испытуемого корма вторично подсчитывают численность стилонихий. В контрольных тестах все стилонихии должны оставаться живыми.

Для того чтобы за время экспозиции растворы в лунках не подсохли, под блок микроаквариумов или предметные стекла подкладывают смоченную водой фильтровальную бумагу и накрывают их стеклянным колпаком.

Параллельно с биотестированием пробы корма, с целью определения качества ацетона и минерального раствора Лозина-Лозинского проводят контрольные тесты. Для этого в микроаквариумы или лунки (в 3 повторностях) помещают вышеуказанным способом стилонихии и заливают их:

- 200 мкл 1%-ного раствора ацетона в минеральном растворе Лозина-Лозинского ($0,1 \text{ см}^3$ (100 мкл) ацетона на 10 см^3 раствора Лозина-Лозинского);
- 200 мкл минерального раствора Лозина-Лозинского.

Качество ацетона проверяют каждый раз в начале использования новой партии реактива, а качество раствора Лозина-Лозинского – при приготовлении новой порции.

В случае токсичности исследуемого корма стилонихии:

- изменяют свою обычную эллипсоидную форму на округлую, а движение – на беспорядочное с поворотом вокруг своей поперечной оси;

- прекращают движение или подвергаются распаду – лизису (количество лизированных клеток зависит от степени токсичности кормов).

Токсичность исследуемого корма определяют по выживаемости стилонихий через 1 час (при экстракции ацетоном) и через 3 часа (при экстракции водой) экспозиции.

Обработка результатов. Выживаемость стилонихий вычисляют по формуле:

$$N = \frac{N_2}{N_1} \times 100,$$

где N – выживаемость стилонихий (%);
 N_1 – среднеарифметическое (из 5 испытаний) значение количества стилонихий в начале опыта (шт);
 N_2 – среднеарифметическое (из 5 испытаний) значение количества стилонихий в конце опыта через 1 час экспозиции (шт).

Вычисления проводят с точностью до первого десятичного знака, а окончательный результат испытания регистрируют в протоколе с округлением до целого числа. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 1%.

Токсичность испытуемого корма определяют из расчета в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Оценка токсичности исследуемых кормов

Вид корма	Выживаемость стилонихий, %		
	корм нетоксичный	корм слаботоксичный	корм токсичный
комбикорма для свиней	от 80 до 100	от 40 до 79	от 0 до 39
комбикорма для других видов продуктивных и непродуктивных животных, птиц и рыб	от 70 до 100	от 40 до 69	от 0 до 39
фуражное зерно и продукты его переработки, концентрированные компоненты комбикормов			

Результаты испытаний записывают в журнал и оформляют акт экспертизы или протокол испытаний, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его использования.

Нетоксичным следует считать корм, если при параллельном биотестировании как водного раствора ацетонового экстракта, так и водного раствора испытуемого корма определено, что он нетоксичный. Нетоксичный корм дальнейшему исследованию не подлежит и используется по назначению без ограничений.

Слаботоксичные и токсичные корма (хотя бы по 1 из испытанных экстрактов) направляют на биотестирование основными методами, а также на микологические, химико-токсикологические и бактериологические исследования.

4.1.2. Определение токсичности кормов биотестированием на инфузориях *Colpoda steinii*

Принцип метода. Метод основан на извлечении из испытуемых кормов фракций токсичных веществ параллельно ацетоном и водой с последующим воздействием этих веществ на колподы.

Время полного анализа 1 пробы – от 3,5 до 4 часов, 10 проб – от 4,5 до 5 часов.

Простейшие *Colpoda steinii* (рисунок 5) относятся к царству *Chromista*, типу *Ciliophora* (реснитчатых инфузорий), классу *Colpodea*, отряду *Colpodida*, семейству *Colpodidae*. Инфузории рода *Colpoda* – широко распространенные организмы, обычно обнаруживаемые инцистированными на большинстве типов растительности и в большинстве почв. Тело размером 14-60 мкм отчетливо почковидной формы, уплощенное в дорсо-вентральном направлении. Правый край тела сильно выпуклый, левый край – часто вогнутый, как бы откушенный от него. Передний конец килеобразный, на нем имеется 6-7 ребер. Реснички расположены в виде 10-13 рядов. Цитоплазма чаще всего бесцветная, блестящая. На заднем конце расположены 2 более длинные хвостовые реснички, которые в естественном состоянии обычно не видны из-за быстрого движения. Околоротовые реснички образуют «бороду». Инфузории рода *Colpoda* обычно делятся на цисты, из которых выходит от 2 до 8 особей (чаще всего – 4), в результате чего получают генетически идентичные особи. В редких случаях могут делиться на 4 особи без образования стенки цисты. Как и у других инфузорий, делению может предшествовать половой феномен, известный как конъюгация. Помимо своей роли хищников бактерий, колподы сами являются жертвами большого количества видов микроорганизмов. Инфузории *C. steinii* используются в качестве средства для оценки токсичности кормов, воды, почвы, а также в качестве средства для обнаружения химического загрязнения в целом.

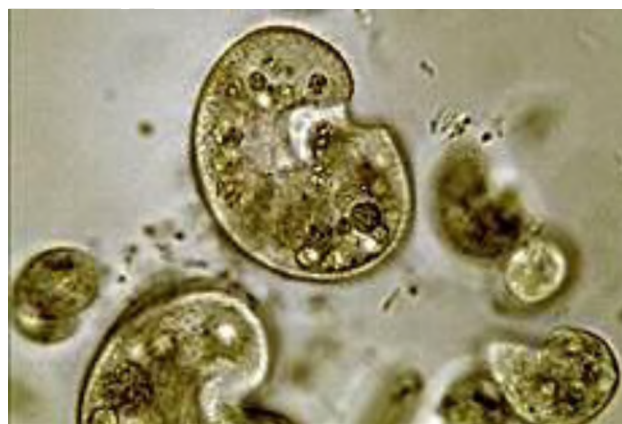


Рисунок 5 – *Colpoda steinii*
[wikimedia.org]

Данный метод предполагает использование сухой культуры колподы в лабораториях, не имеющих возможности постоянно поддерживать в активном физиологическом состоянии стилонихии.

Сухая культура колподы для эколого-токсикологических исследований по внешнему виду представляет собой округлые цисты покоя, прикрепленные к кусочку целлофановой пленки и стенке флакона, видимые при увеличении от 80 до 150. Культуру колподы выпускают во флаконах или ампулах. Каждый

флакон (ампула) рассчитан на получение 2 см^3 активной культуры с концентрацией не менее 5000 клеток в 1 см^3 . В качестве источника питания для колпод используют споры бактерий *Bacillus subtilis*, прикрепленные к кусочку целлофана вместе со спорами колпод. К каждому 2 упаковкам культуры прилагается флакон (ампула) с питательной средой. Срок годности культуры – 1 год от даты выпуска препарата (препарат хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте).

Подготовка к проведению испытаний. Для проведения испытаний не позднее чем за 24 часа до использования вскрывают 2 флакона с культурой колподы и 1 флакон с питательной средой (1 набор). В каждый флакон с культурой колподы наливают по 2 см^3 питательной среды, затыкают ватно-марлевыми пробками и ставят в термостат при температуре $+26 \dots +28^\circ\text{C}$ на 24 часа. За это время происходит массовое эксцистирование спор. При этом полученная культура колподы находится в физиологически активном состоянии, оптимальном для постановки биотеста в течение 3 суток после эксцистирования.

Непосредственно перед применением необходимо убедиться в активности культуры колподы. Для этого каплю культуры исследуют под микроскопом (увеличение 2×14). Колподы в количестве не менее 50 клеток в поле зрения должны активно двигаться.

Кроме этого необходимо проверять активность культуры (новой партии) на модельном токсиканте. Для этого следует смешать на предметном стекле каплю культуры с такой же по объему каплей рабочего раствора сульфата меди ($0,1 \text{ мг/дм}^3$). В течение 30 минут должны оставаться живыми и подвижными не менее 50% колпод.

Для подготовки среднюю пробу испытуемого корма измельчают до прохода через сито с ячейками диаметром 1 мм. Полученный таким образом однородный корм готовят параллельно 2 способами: экстракцией токсичных соединений из корма ацетоном с последующим разведением ацетонового экстракта водным минеральным раствором Лозина-Лозинского или экстракцией токсических соединений из корма водным минеральным раствором Лозина-Лозинского для дополнительного обнаружения водорастворимых токсинов.

Проведение испытания. Из флакона отбирают 20 мкл питательной среды с колподами и помещают в микроаквариум или в лунку предметного стекла. Приливают либо 200 мкл водного раствора ацетонового экстракта, либо 200 мкл водного экстракта испытуемого корма.

В контрольных тестах (проводят 3-кратно при смене партии свежеприготовленного раствора Лозина-Лозинского) к 20 мкл раствора с инфузориями приливают 200 мкл минерального раствора Лозина-Лозинского, а для проверки качества ацетона к 20 мкл раствора с инфузориями приливают 200 мкл 1 %-ного раствора ацетона в минеральном растворе Лозина-Лозинского ($0,1 \text{ см}^3$ ацетона (100 мкл) на 10 см^3 раствора Лозина-Лозинского).

Время анализа в случае испытания водного раствора ацетонового экстракта – 1 час, в случае испытания водного экстракта – 3 часа (для того, чтобы в период экспозиции растворы в лунках не подсохли, под блок микроаквариумов

или предметные стекла подкладывают смоченную водой фильтровальную бумагу и накрывают их стеклянным колпаком).

По истечении всего времени анализа просматривают весь объем микроаквариума или лунки и учитывают наличие живых колпод. Если образец токсичен, то живых колпод не обнаруживают (поле зрения пусто) или находят единичные малоподвижные клетки.

Обработка результатов. Критерием определения токсичности служит время от начала воздействия испытуемого раствора до гибели большинства (более 90%) колпод, факт которой констатируют на основании полного прекращения ими движения и наличия лизиса клеток. В контрольном тесте все колподы должны оставаться подвижными.

Таблица 4 – Оценка токсичности исследуемых кормов

Токсичность кормов	Оценка токсичности
<i>Корм нетоксичный</i>	по истечении всего времени экспозиции (1 час для анализа водного раствора ацетонового экстракта и 3 часа для анализа водного экстракта) большинство (около 90%) колпод остались подвижными
<i>Корм слаботоксичный</i>	гибель колпод наступила в интервале до 1 часа при анализе водного раствора ацетонового экстракта корма или до 3 часов – при анализе водного экстракта
<i>Корм токсичный</i>	гибель колпод наступила в интервале до 10 минут экспозиции как в случае анализа водного раствора ацетонового экстракта, так и в случае анализа водного экстракта корма

Результаты испытаний заносят в журнал и оформляют акт экспертизы или протокол испытания, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его использования.

Нетоксичным следует считать корм, если при параллельном биотестировании как водного раствора ацетонового экстракта, так и водного раствора испытуемого корма определено, что корм нетоксичный. Нетоксичный корм дальнейшим испытаниям не подлежит и используется по назначению без ограничений. *Слаботоксичные* и *токсичные* корма направляют на дополнительное биотестирование основными методами, а также на микробиологические и химикотоксикологические испытания.

4.1.3. Определение токсичности кормов биотестированием на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*

Принцип метода. Метод основан на извлечении ацетоном из анализируемых кормов токсичных веществ, выпаривании ацетона, растворении остатка в пептонной среде, последующем воздействии полученных экстрактов на инфузории *Tetrahymena pyriformis* и подсчете живых и погибших инфузорий.

Тест-организмы – инфузории *Tetrahymena pyriformis*, идентифицированные по морфологическим признакам согласно определителю простейших и протестированные на активность с помощью модельного токсиканта.

Простейшие *Tetrahymena pyriformis* (рисунок 6) относятся к царству *Chromista*, типу *Ciliophora* (реснитчатые инфузории), классу *Oligohymenophorea*, отряду *Hymenostomatida*, семейству *Tetrahymenidae*.

Тело *T. pyriformis* размером 50-60 × 30 мкм и обычно имеет грушевидную форму, что является характеристикой, от которой произошло название вида. Возможны различные модификации формы в старых или подвергнутых стрессу культурах. 18 продольных рядов ресничек (кинеты) покрывают поверхность клетки.

T. pyriformis – свободноживущий пресноводный вид, с тенденцией к гистиотрофии и факультативному паразитизму, цист делений не образует. Размножается делением через 2,5-6 часов. Тип пищеварения кислотнo-щелочной. Оптимум рН для роста 6,5-7,5. Температурные границы находятся в пределах +13...+28 °С; при температуре ниже +18 °С рост резко замедляется, при температуре выше +30 °С инфузория гибнет, при +37 °С – лизируется. В лабораторных условиях культивируется при комнатной температуре +22±3°С. Хорошо переносит 1%-ный раствор поваренной соли, но гибнет в 2%-ном. *T. pyriformis* относится к аэробам, поэтому слой среды для ее культивирования не должен превышать 1,5-2 см (лучшие условия для аэрации). Двигутся инфузории при помощи ресничек и жгутиков. В норме это движение можно охарактеризовать как прямолинейное поступательное.



Рисунок 6 – *Tetrahymena pyriformis* [enfo.hu]

По потребностям в аминокислотах *T. pyriformis* близко стоит к высшим животным. Это наиболее распространенная модель простейших, используемая в токсикологических исследованиях. Инфузории характеризуются коротким жизненным циклом, что позволяет легко культивировать их в подходящих лабораторных условиях. Также можно проверить токсическое воздействие веществ на несколько поколений.

По потребностям в аминокислотах *T. pyriformis* близко стоит к высшим животным. Это наиболее распространенная модель простейших, используемая в токсикологических исследованиях. Инфузории характеризуются коротким жизненным циклом, что позволяет легко культивировать их в подходящих лабораторных условиях. Также можно проверить токсическое воздействие веществ на несколько поколений.

Подготовка к испытаниям. Для приготовления рабочей среды в 100 см³ дистиллированной воды растворяют 0,5 г пептона, 0,5 г D-глюкозы, 0,1 г дрожжевого экстракта, 0,1 г хлористого натрия. Раствор разливают в пробирки по 3-5 см³, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют при температуре +130°С в течение 30 минут (пробирки с рабочей средой хранят в холодильнике при температуре +10±1°С в течение 6 месяцев).

Пробирки с рабочей средой засевают над горелкой микробиологической петлей из культивационной пробирки с инфузориями и устанавливают в термостат с температурой +25°С. Через 2 суток из засеянных пробирок инфузории используют при биотестировании в течение 5 суток.

Для хранения культуры *T. pyriformis* пробирку с культурой на 7-й день после пересадки переносят из термостата в холодильник с температурой $+10\pm 1^\circ\text{C}$, где культура хранится в течение 3 месяцев.

При случайном заражении культуры *T. pyriformis* посторонней микрофлорой (признаками бактериального заражения среды с инфузориями может быть наличие в пробирках осадка в виде хлопьев, повышенной мутности среды или бактериального кольца на верхней границе среды) культуру пересевают на рабочую среду с добавлением антибиотика амоксицилина – 0,01 г на 100 см^3 среды. После 2-3 пересеваний на среду, содержащую антибиотик, при условии отсутствия бактериальной зараженности культуру пересевают на рабочую среду.

Проведение испытаний. Для экстрагирования токсичных веществ из проб корма навеску анализируемого корма массой около 50 г помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3 , приливают 100 см^3 ацетона и экстрагируют на аппарате для встряхивания жидкостей в течение 1 часа. Затем раствор осторожно сливают через бумажный фильтр в колбу или выпарительную чашку. Повторное экстрагирование проводят 50 см^3 ацетона в течение 30 минут. Жидкость сливают через бумажный фильтр, промывают его от 10 до 20 см^3 ацетона. Экстракты объединяют и выпаривают на водяной бане при температуре $+50\dots+60^\circ\text{C}$ в вытяжном шкафу до полного испарения ацетона.

После выпаривания в чашку вносят от 1 до 2 см^3 ацетона, чтобы смыть маслянистый экстракт со стенок чашки, и приливают 10 см^3 пептонной среды. Перемешивают и выпаривают содержимое до полного удаления запаха растворителя, фильтруют в виалы и, используя рН-метр, доводят до 7-7,5 ед. рН раствором гидроксида натрия молярной концентрации 0,1 или $0,01\text{ моль/дм}^3$.

Параллельно готовят контрольный экстракт с целью определения качества ацетона и рабочей среды. Для этого проводят выпаривание растворителя (без навески анализируемого корма), внесение среды, доведение значения рН вышеуказанным способом. Полученный контрольный экстракт должен быть нетоксичным. Качество ацетона проверяют каждый раз при использовании новой партии, а качество питательной среды – при приготовлении новой порции.

Биотестирование для каждой пробы проводят в 3 параллельных испытаниях. В каждую из 3 пробирок типа Эппендорф вносят по $0,11\text{ см}^3$ подготовленной культуры инфузорий *T. pyriformis*. Отбирают пипеточным дозатором из каждой пробирки $0,01\text{ см}^3$ культуры, помещают на предметное стекло и подсчитывают количество инфузорий. Добавляют в каждую пробирку $0,1\text{ см}^3$ экстракта и оставляют при комнатной температуре.

Через 60 минут подсчитывают количество живых инфузорий в $0,01\text{ см}^3$ на предметном стекле под микроскопом, просматривая весь объем капли и все ее слои.

Обработка результатов. Степень токсичности корма определяют по количеству живых и погибших инфузорий через 60 минут после начала биотестирования.

Для этого рассчитывают коэффициент выживаемости инфузорий по формуле:

$$K_1 = \frac{2 \cdot S_2}{S_1} \times 100 ,$$

где K_1 – коэффициент выживаемости инфузорий (%);
 S_1 – среднеарифметическое значение (3 испытаний) количества инфузорий в 0,01 см³ среды культивирования до введения пробы;
 S_2 – среднеарифметическое значение (3 испытаний) количества инфузорий в 0,01 см³ среды культивирования через 60 минут после введения пробы.

На основании вычисленного коэффициента выживаемости оценивают токсичность исследуемого корма в соответствии с таблицей 5:

Таблица 5 – Оценка токсичности исследуемых кормов

Токсичность кормов	Оценка токсичности $K_1, \%$
<i>Корм нетоксичный</i>	90
<i>Корм слаботоксичный</i>	от 50 до 90
<i>Корм токсичный</i>	не более 50

Результаты испытаний записывают в журнал, оформляют акт экспертизы или протокол испытаний, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его использования.

Нетоксичный корм дальнейшему исследованию не подлежит и используется по назначению без ограничений. *Слаботоксичный* и *токсичный* корма направляют на биотестирование основными методами, а также на микологические, химико-токсикологические и бактериологические исследования.

4.2. Основные методы определения общей токсичности кормов

Основные методы (подтверждающие и окончательные) предусматривают исследования кожной биопробы на кроликах и биопробы на мышах, которые в течение времени от 3 до 5 суток позволяют дать окончательное заключение о токсичности корма.

Эти методы применяют как для всех испытуемых кормов, так и для кормов, определенных экспресс-методами как токсичные, а также при возникших разногласиях (в качестве арбитражных методов).

Методы основаны на испытании кормов растительного и животного происхождения, а также комбикормов для продуктивных и непродуктивных животных и кормовых добавок методом биотестирования параллельно на кроликах (кожная проба) и на мышах (острый опыт), что дает возможность учесть как дермoneкротическое действие токсинов, так и их воздействие на пищеварительную систему теплокровных животных.

Результат определяют по совокупности реакций в обоих методах:

- корм нетоксичный (нетоксичен в обоих тестах);
- корм токсичный (токсичен хотя бы в 1 тесте).

При этом готовят и вводят мышам либо ацетоновый экстракт (если по результатам экспресс-биотеста токсичен был ацетоновый экстракт корма), либо водный экстракт (если по результатам экспресс-биотеста токсичен был водный экстракт). Такой анализ дает возможность учесть действие водорастворимых и растворимых в ацетоне токсинов.

Отдельные концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки (премиксы, белково-витаминные комплексы, минеральные и витаминные добавки, заменители цельного молока) предварительно смешивают в требуемом количестве с образцом размолотого нетоксичного на 100% зерна пшеницы.

4.2.1. Определение токсичности кормов биопробой на кроликах

Принцип метода. Метод основан на дермонекротическом воздействии на кожу кролика токсичных веществ, в основном микогенного происхождения, извлекаемых из кормов ацетоном.

Подготовка к испытанию. Среднюю пробу корма измельчают и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Для приготовления ацетонового экстракта испытуемого корма в колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 500 см³ помещают 50 г измельченного корма, заливают его 150 см³ ацетона и оставляют для экстракции на 24 часа или экстрагируют в течение 3 часов на аппарате для встряхивания жидкостей. Слой экстрагента над пробой должен быть не менее 1 см.

После окончания экстракции жидкость фильтруют через бумажный фильтр и помещают в чашку для выпаривания. Оставшийся в колбе корм дополнительно промывают небольшой порцией экстрагента (не менее 20 см³), эту промывную жидкость фильтруют через тот же фильтр в ту же чашку.

Экстракт концентрируют в вытяжном шкафу до полного удаления запаха растворителя и получения маслянистого остатка желтоватого или коричневого оттенка. Для ускорения процесса чашку для выпаривания с экстрактом помещают на водяную баню температурой +45...+50°С.

Периодически оседающий на стенках чашки осадок смывают на дно чашки, покачивая ее и обмывая стенки растворителем. Экстракт, оставшийся на стенках чашки, смывают экстрагентом на дно, затем снова концентрируют. В чашку, при необходимости, добавляют растительного масла в таком количестве, чтобы общий объем пробы был не менее 1 см³. Экстракт хранят в холодильнике.

При одновременном тестировании ацетонового экстракта данного образца на кроликах и мышах берут навеску массой 150 г, помещают ее в коническую колбу на 1000 см³ и заливают 300-400 см³ ацетона.

У кролика на участке кожи с размерами 6×6 см в области бедра, лопатки или бока в день постановки испытания тщательно выстригают волосяной по-

кров (до полного оголения). Не допускается для испытания кожа поврежденная, пигментированная, а также с признаками шелушения.

На 1 кролике допускается ставить одновременно не более 4 проб. Повторное использование кролика для постановки биопробы допускается лишь при получении отрицательных результатов предыдущих испытаний и полного восстановления шерстного покрова.

Все корма для вивариумных животных, используемых в биотестировании, должны быть непременно проверены на общую токсичность и иметь отрицательные результаты. В противном случае в крови животных будет идти процесс накопления антигенов, который выражается в аллергической реакции кожи. Постановка биотеста на таком животном даст искаженные результаты испытания.

Проведение испытания. На выстриженный участок кожи кролика стеклянной или пластиковой лопаткой наносят, слегка втирая, половину экстракта, вторую половину экстракта оставляют в холодильнике для повторного нанесения на следующий день. В качестве контроля используют 1 оголенный участок кожи размером 6×6 см, на который не наносят экстракт.

С целью предупреждения слизывания экстракта, нанесенного на кожу, на шею кролика надевают воротник, который снимают не ранее чем через 3 суток после первого нанесения экстракта.

Наблюдение за реакцией (рисунок 7) начинают на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжают в течение 3 суток.

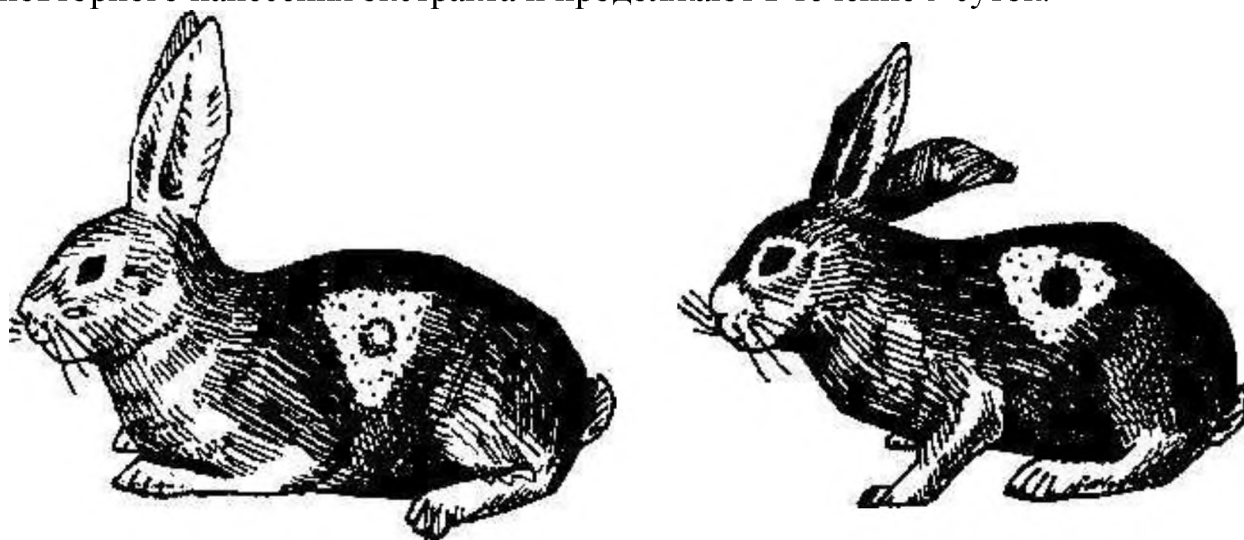


Рисунок 7 – Реакция кожной токсичности (дерматонекротическая проба) на кроликах: слева – отрицательная, справа – положительная

[Кисленко В. Н., 2005]

Новую партию растительного масла, используемого для разбавления экстракта, необходимо предварительно проверить на токсичность. Для этого выстриженный участок кожи дважды (с интервалом в сутки) смазывают растительным маслом и учитывают кожную реакцию. Масло не должно вызывать покраснения кожи.

Обработка результатов. Токсичность исследуемых кормов определяют по наличию воспалительного процесса на участке кожи с нанесенным экстрактом (таблица 6).

Таблица 6 – Оценка токсичности исследуемых кормов

Степень токсичности кормов	Признаки
<i>Корм нетоксичный</i>	отсутствует воспалительная реакция кожи (допускается наличие гиперемии, сохраняющейся не более 2 суток после повторного нанесения экстракта и не сопровождающейся шелушением кожи)
<i>Корм токсичный</i>	наблюдаются гиперемия, сохраняющаяся 3 суток и более после повторного нанесения экстракта на кожу, шелушение, болезненность, уплотнение или отечность кожи, возможны точечные капиллярные кровоизлияния. В случае крайней степени токсичности корма по всей поверхности участка кожи появляются язвы, затем образуется сплошной струп

Результаты испытаний кормов записывают в журнал и оформляют акт экспертизы или протокол испытаний, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его применения.

Нетоксичный корм используют по назначению без ограничений. *Токсичные* корма использованию не подлежат.

4.2.2. Определение общей токсичности кормов в опыте на мышах

Принцип. Метод основан на извлечении токсичных веществ из кормов растительного и животного происхождения, комбикормов и кормовых добавок ацетоном или водой (в зависимости от результатов экспресс-биотеста) и введении экстракта однократно в желудок белым мышам.

Подготовка к испытанию. Для подготовки пробы для испытаний среднюю пробу испытываемого корма измельчают и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки анализируют по схеме биотестирования комбикормов, предварительно введя эти вещества в количестве, определенном рецептом или зоотехническими нормами в размолотый образец проверенного биотестированием, нетоксичного на 100% зерна пшеницы.

Для приготовления ацетонового экстракта испытываемого корма в колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 500 см³ помещают 100 г измельченного корма, наливают 200-300 см³ ацетона и экстрагируют в течение 3 часов на аппарате для встряхивания жидкостей. Слой экстрагента над пробой должен быть не менее 1 см.

После окончания экстракции жидкость фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) и помещают в чашку для выпаривания. Оставшийся в колбе корм дополнительно промывают небольшой порцией экстрагента (не менее 20 см³), промывную порцию фильтруют через тот же фильтр. Экстракт концентрируют

в вытяжном шкафу до полного удаления запаха растворителя и получения маслянистого остатка желтоватого или коричневого оттенка. Для ускорения процесса чашку для выпаривания с экстрактом помещают на водяную баню с температурой +45...+50°C.

Периодически оседающий на стенках чашки осадок смывают на дно чашки, покачивая ее и обмывая растворителем.

Экстракт, оставшийся на стенках чашки, смывают экстрагентом на дно, затем снова концентрируют. Добавляют в чашку 2,5 см³ растительного масла (кроме экстракта из жмыхов). При необходимости экстракт можно хранить в холодильнике не более 3 суток.

Для приготовления водного экстракта испытуемого корма пробу массой 50 г помещают в коническую колбу на 500 см³ и приливают 200 см³ дистиллированной воды. Колбу помещают на аппарат для встряхивания жидкостей на 20 минут. По окончании экстракции содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (белая лента). Полученный водный экстракт испытуемого корма можно хранить в холодильнике не более 2 суток.

В отдельную клетку отсаживают 5 белых мышей весом от 16 до 25 г и выдерживают их без корма в течение 4-5 часов.

Все корма для кормления вивариумных животных, используемых в биотестировании, должны быть непременно проверены на общую токсичность и иметь отрицательные результаты.

Проведение испытания.

5 мышам с помощью шприца с тупой изогнутой иглой длиной от 3 до 4 см вводят 1-кратно через рот в желудок 0,5 см³ выпаренного остатка ацетонового экстракта корма или 0,5 см³ водного экстракта корма (рисунок 8).

Наблюдают за мышами в течение 3 суток, не ограничивая их в кормах и воде.

При отсутствии падежа мышей убивают (усыпляют медицинским эфиром) и вскрывают.

В качестве контрольного испытания 5 белым мышам вводят:

- растительное масло (в случае ацетоновой экстракции), которым развели экстракт корма;
- дистиллированную воду (в случае водной экстракции).

Контрольное испытание на масло проводят каждый раз при смене партии масла. Необходимо соблюдать сроки хранения масла.

Контрольное испытание на дистиллированную воду ставят каждый раз перед испытанием водного экстракта корма.

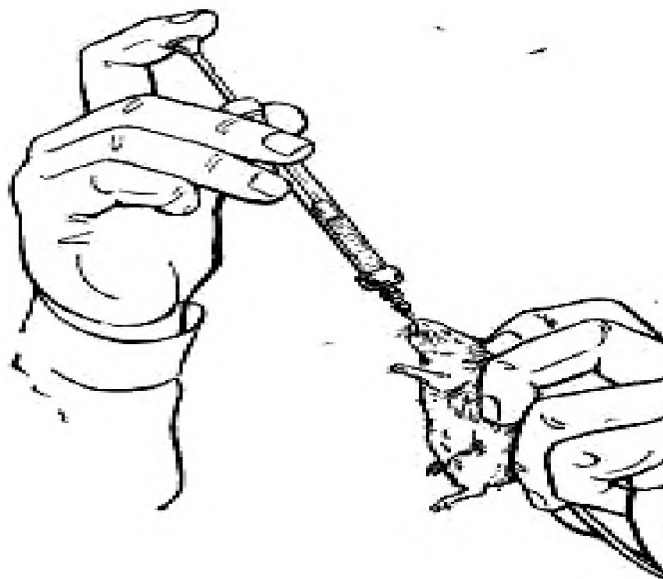


Рисунок 8 – Введение экстракта в желудок мыши при помощи металлического зонда

Обработка результатов. Учет реакции ведут на основании анализа состояния внутренних органов (желудочно-кишечного тракта, печени, селезенки, почек) при вскрытии мышей (таблица 7).

Таблица 7 – Оценка токсичности исследуемых кормов

Степень токсичности кормов	Гибель мышей	Патологоанатомические изменения у павших и убитых мышей
<i>Корм нетоксичный</i>	все мыши живы	не обнаружено
<i>Корм токсичный</i>	гибнут все или хотя бы 1 мышь	геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек, селезенки или кровоизлияниями в паренхиматозных органах

При параллельном анализе на кроликах и мышах нетоксичным считают корм, который окажется нетоксичным в обоих вариантах анализа.

Результаты испытаний кормов записывают в журнал и оформляют акт экспертизы или протокол испытания о наличии или отсутствии токсичности корма и возможности его применения. Нетоксичные корма используют по назначению без ограничений. Токсичные корма использованию не подлежат.

4.3. Определение токсичности кормов на сельскохозяйственных животных

В случаях если токсичность корма не выявлена вышеперечисленными методиками, для установления роли кормов в возникновении заболеваний невыясненной этиологии применяют скармливание подозрительных кормов тем видам животных, которые болели в хозяйстве.

При постановке биопробы непосредственно в хозяйстве подопытным животным (3-5 голов) скармливают подозрительные корма в количестве, предусмотренном суточным рационом для данного вида животного.

Корма дают без перерыва в течение 10 дней.

За подопытными животными ведут ежедневные клинические наблюдения и учитывают температуру, пульс, дыхание, деятельность желудочно-кишечного тракта, состояние слизистых оболочек, особенно ротовой полости, общее поведение животных. Одновременно ведут учет количества съеденного корма.

Положительными показателями биопробы являются:

- потеря в живой массе;
- расстройства пищеварения (понос, запор, атония с тимпанией или без нее, усиление саливации, скрежетание зубами, стоматит, рвота у свиней, пониженный аппетит);
- нарушение координации движений, дрожь, угнетение;
- аборты;
- температура может быть нормальной или пониженной.

5. МИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРМОВ

5.1. Выявление фитопатогенных грибов, развивающихся только в период вегетации злаков

Санитарно-показательными фитопатогенными грибами являются спорынья и головневые грибы.

Спорынья (*Claviceps purpurea*) поражает культурные и дикорастущие злаки в период вегетации, при этом на зараженных колосьях ко времени созревания вместо зерен образуются буро-фиолетовые склероции («рожки») длиной до 15 мм. При скармливании животным кормов, содержащих такие склероции (в грубых кормах, зерне) или их частицы (в комбикормах, продуктах переработки зерна), может возникнуть отравление – эрготизм.

Головня, вызываемая головневыми грибами (*Ustilaginales*), в зерновом фураже может обнаруживаться как в виде пораженных зерен (мешочков) или их обломков, так и в виде распыленных спор (хламидоспор), приставших к оболочке зерна («синегузочное» и «мараное» зерно).

Определение содержания примеси головни и спорыньи в зерне (ГОСТ 30483-97)

Из средней пробы, освобожденной от крупной сорной примеси (путем просеивания через сито с отверстиями диаметром 6 мм), выделяют навески массой:

- для определения спорыньи – 500 г;
- для определения головни пшеницы, ржи и других культур, кроме ячменя – 200 г;
- для определения головни ячменя – 500 г.

Навески взвешивают с точностью до первого десятичного знака и разбирают вручную. Обнаруженные компоненты вредной примеси группируют отдельно по видам и взвешивают с точностью до второго десятичного знака.

Содержание каждого вида вредной примеси вычисляют по формуле:

$$X_{\text{в}} = \frac{m_{\text{в}}}{m_{\text{н}}} \times 100,$$

где $X_{\text{в}}$ – содержание вредной примеси (%);
 $m_{\text{в}}$ – масса выделенного вида вредной примеси (г);
 $m_{\text{н}}$ – масса навески (г).

Вычисление вредной примеси проводят до второго десятичного знака без последующего округления результата.

Определение содержания головневых зерен (ГОСТ 30483-97)

Головневыми зернами считают синегузочные и мараные зерна. К *синегузочным* относят зерна пшеницы, у которых запачканы спорами головни только бородки; к *мараным* – зерна пшеницы, у которых запачканы спорами головни не только бородки, но и поверхность зерновки и бороздки.

Из средней пробы зерна, освобожденной от крупной сорной примеси (путем просеивания через сито с отверстиями диаметром 6 мм), выделяют навески массой:

- пшеницы, ржи, ячменя (в том числе пивоваренного), гречихи, овса, риса, чечевицы мелкосеменной, вики – 50 г;
- проса, сорго – 25 г;
- кукурузы, гороха, фасоли, нута, чины, люпина, чечевицы тарелочной – 100 г.

Навески взвешивают с точностью до первого десятичного знака.

Из выделенной навески зерна, освобожденной от сорной и зерновой примесей, выделяют навеску массой 20 г и взвешивают ее с точностью до второго десятичного знака.

Из массы зерен в навеске без применения лупы выбирают головневые зерна и взвешивают их с точностью до второго десятичного знака.

Содержание головневых зерен вычисляют по формуле:

$$X_{\text{г}} = \frac{m_{\text{г}}}{20} \times 100 = 5m_{\text{г}},$$

где $X_{\text{г}}$ – содержание головневых зерен (%);

$m_{\text{г}}$ – масса головневых зерен, выделенных из навески массой 20 г (г).

Определение содержания спор головневых грибов в зерне (ГОСТ 13496.11-74)

Сущность метода заключается в предварительном отмывании спор головни от зерна, последующем осаждении их на бумажном фильтре фильтрованием под вакуумом, взвешивании и вычислении их процентного содержания.

Подготовка к испытанию. Фильтрацию проводят с помощью модифицированного прибора Зейтца (рисунок 9).

В нижнюю треть цилиндрической части прибора Зейтца вставляют кольцо размером, равным внутреннему диаметру прибора, изготовленное из стальной проволоки диаметром 1-2 мм. На кольцо помещают металлическую сетку размером, равным внутреннему диаметру прибора, с величиной ячеек 2-4 мм.

Из полотна сита №0105 вырезают 2 кружка диаметром, равным внутреннему диаметру цилиндрической части прибора Зейтца, и кладут их на металлическую сетку.

Из фильтра «синяя лента» вырезают кружок диаметром на 0,3 см больше внешнего диаметра прибора Зейтца, обезжиривают его в эфире для наркоза или

этиловом эфире в течение 20-30 минут и после высушивания взвешивают на аналитических весах до тысячных долей грамма.

Фильтр помещают в разъемную часть прибора на резиновую прокладку, размер которой должен быть равен внешнему диаметру прибора (резиновую прокладку предварительно выдерживают в эфире в течение 2-3 часов).

Под резиновую прокладку помещают металлическую сетку, приложенную к прибору, и затем соединяют цилиндрическую и конусовидную части прибора винтами.

Прибор Зейтца вставляют в отверстие пробки, которой закрыта колба Бунзена. Колбу Бунзена соединяют шлангом с водоструйным насосом или с вакуум-насосом Комовского.

Проведение испытания. Навеску исследуемого зерна массой 50 г, взвешенную на лабораторных весах, помещают в колбу вместимостью 250 мл и заливают 100 мл эфира для наркоза или этилового эфира.

Зерно с эфиром взбалтывают в колбе в течение 1 минуты и после отстаивания в течение 10-20 секунд для осаждения частиц почвы и песка жидкость сливают в прибор Зейтца.

Промывку зерна серным эфиром с предварительным взбалтыванием и отстаиванием проводят до получения бесцветной жидкости в колбе с навеской зерна.

По окончании фильтрации прибор разбирают, фильтр извлекают и после 5 минут выдерживания в вытяжном шкафу его взвешивают на аналитических весах до тысячных долей грамма.

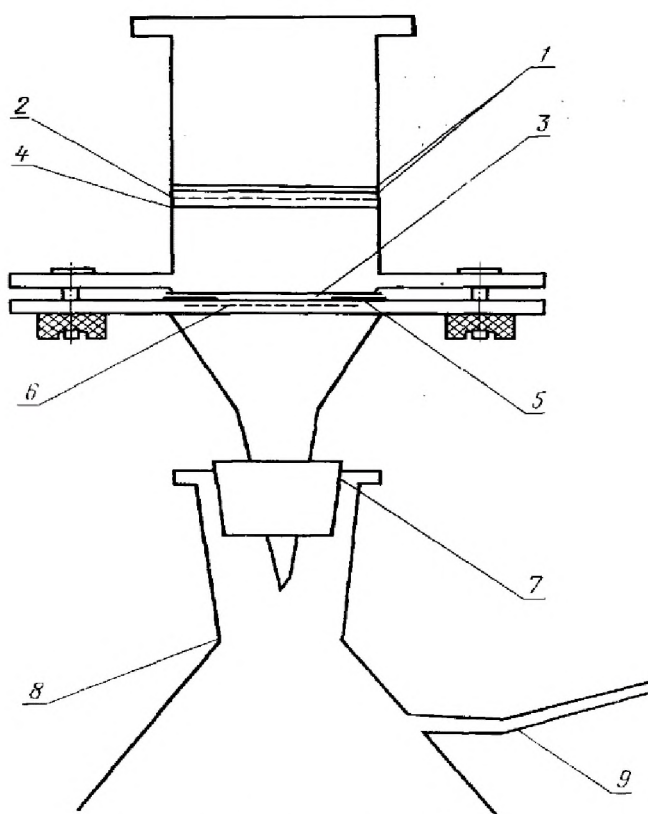
Все операции, связанные с использованием эфира, проводят в вытяжном шкафу.

Обработка результатов. Содержание спор головневых грибов вычисляют по формуле:

$$X = (m_2 - m_1) \cdot 2,$$

где X – содержание спор головневых грибов (%);

m_1 – масса фильтра до фильтрации (г);



1 – кружки из полотна сита; 2 – металлическая сетка; 3 – бумажный фильтр; 4 – кольцо из стальной проволоки; 5 – резиновая прокладка; 6 – сеточка; 7 – резиновая пробка; 8 – колба Бунзена; 9 – шланг к насосу

Рисунок 9 – Модифицированный прибор Зейтца (схема)

[ГОСТ 13496.11-74]

m_2 – масса фильтра после фильтрации (г).

Определение содержания спор головневых грибов в комбикормах и продуктах переработки зерна (ГОСТ 13496.10-2017)

Сущность метода заключается в обнаружении и подсчете спор головневых грибов в счетной камере Горяева и дальнейшем вычислении их содержания.

Подготовка к испытанию. Лабораторную пробу измельчают до прохода через сито с размером стороны квадратной ячейки 1 мм.

Для приготовления 0,5%-ного раствора гидроксида калия $5,00 \pm 0,01$ г гидроксида калия переносят в стакан и растворяют в 1000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Проведение испытания. Навеску комбикорма массой $10 \pm 0,01$ г помещают в фарфоровую ступку и высушивают в предварительно нагретом сушильном шкафу при температуре $+100^\circ\text{C}$ в течение 15 минут.

Высушенную навеску тщательно растирают в фарфоровой ступке, периодически (3-5 раз) добавляя по 3 см^3 эфира для равномерного распределения спор головневых грибов.

Готовят суспензию для микроскопирования с целью контроля равномерности распределения спор гриба в навеске. Для этого в каплю воды на предметном стекле с помощью препаровальной иглы, смоченной в воде, помещают небольшое количество навески комбикорма, растертой в эфире, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом. В хорошо растертой навеске не должно содержаться склеенных в кучки спор. На 1 стекле готовят одновременно 2 экземпляра суспензии.

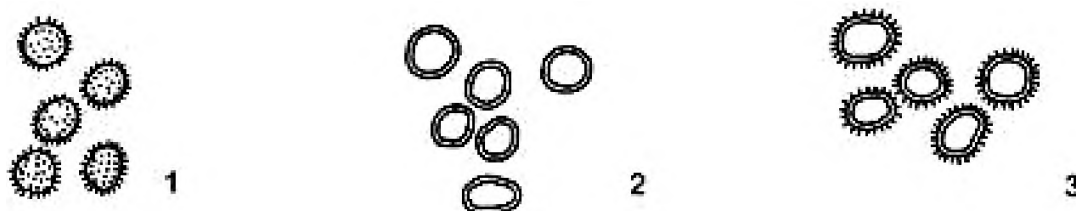
Подготовленную навеску комбикорма массой $0,1 \pm 0,001$ г помещают в пробирку, приливают 10 см^3 раствора гидроксида калия, взбалтывают, нагревают над пламенем горелки до кипения и охлаждают.

Тщательно перемешав содержимое пробирки, тонко оттянутой пастеровской пипеткой сразу же берут небольшое количество взвеси комбикорма и вносят ее в счетную камеру Горяева.

Просмотр и подсчет спор (рисунок 10) производят с помощью микроскопа при хорошем освещении и увеличении в 200-300 раз. Считают количество спор на всей сетке камеры, площадь которой равна 9 мм^2 (при наличии половинок спор каждые 2 половинки считают за 1 целую спору).

Споры грибов хорошо различимы под микроскопом. Споры одноклеточные, шаровидные, но могут быть продолговатыми, эллиптическими или неправильной формы. Цвет спор желтоватый, коричневатый, оливковый. Оболочка гладкая либо бородавчатая, щетинистая, сетчато-утолщенная.

Для исследуемой пробы комбикорма проводят не менее 6 определений, после чего вычисляют среднеарифметическое результатов подсчетов спор.



1 – *Ustilago tritici*; 2 – *Ustilago hordei*; 3 – *Ustilago zaeae*; 4 – *Ustilago nuda*;
5 – *Ustilago panici-miliacei*

Рисунок 10 – Споры головневых грибов
[ГОСТ 13496.10-2017]

Обработка результатов. Содержание спор головневых грибов вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,1\alpha}{22} ,$$

где X – содержание спор головневых грибов (%);
 α – среднееарифметическое значение найденного количества спор;
22 – количество спор головневых грибов, установленное опытным путем для комбикорма, содержащего 0,1% головни.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака с последующим округлением до второго десятичного знака. Допускаемые расхождения между результатами контрольных испытаний не должны превышать 0,01%.

Определение содержания спорыньи в комбикормах и продуктах переработки зерна (ГОСТ 13496.5-2018)

Сущность метода заключается в отделении частиц склероциев спорыньи от массы комбикорма или кормовой смеси путем обработки навески пробы хлороформом, этиловым спиртом и 3н раствором гидроксида натрия или гидроксида калия.

Подготовка к испытанию. Пробу массой 1 кг размалывают на лабораторной мельнице до прохода через сито со стороной квадратной ячейки 1 мм (или диаметром отверстий 1 мм), тщательно перемешивают и разравнивают тонким слоем, затем не менее чем из 5 точек берут 5 навесок массой $1 \pm 0,01$ г каждая.

Для приготовления 3н растворов гидроксида натрия или гидроксида калия в 1 дм^3 дистиллированной воды растворяют 120 г гидроксида натрия или 168,33 г гидроксида калия.

Проведение испытания. Навеску помещают в стеклянную бюксу, приливают 10 см³ хлороформа и взбалтывают, затем при постоянном встряхивании добавляют небольшими порциями 5 см³ этилового спирта.

Темные частицы спорыньи вместе с небольшим количеством частиц пробы всплывают на поверхность, остальная масса пробы оседает на дно.

Затем осторожно, не допуская смешивания слоев, по стенке бюксы доливают раствор гидроксида натрия (или гидроксида калия) с таким расчетом, чтобы он покрыл всю поверхность жидкости слоем не более 3 мм.

При ярком освещении в желтоватом слое щелочи хорошо различимы красновато-фиолетовые частицы наружных слоев и серовато-сиреневые частицы внутренних слоев склероциев спорыньи.

Просмотр и подсчет частиц спорыньи проводят при помощи лупы. Проводят 5 параллельных определений исследуемой пробы.

Обработка результатов. За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение 5 параллельных определений. Содержание спорыньи определяют по таблице 8.

Таблица 8 – Содержание спорыньи в корме в зависимости от количества ее склероциев в исследуемой пробе

Среднеарифметическое количество частиц спорыньи	Содержание спорыньи, %
до 1 включ.	0,05
св. 1 до 2 включ.	0,10
св. 2 до 4 включ.	0,25

5.2. Выявление токсикогенных грибов, способных развиваться в период хранения корма

Особую опасность для животноводства представляют грибы, способные развиваться в хранящейся массе корма. К ним относятся продуценты большинства известных в настоящее время микотоксинов, таких как афлатоксины, зеараленон, Т-2 токсин и др.

Микологическое исследование кормов с целью выявления этой группы грибов включает первичное выделение грибов из кормов путем посева их на питательные среды, выделение грибов из первичных посевов в чистые культуры и идентификацию их.

5.2.1. Первичное выделение грибов из кормов

Первичное выделение грибов из кормов проводят путем посева их на питательную среду в чашки Петри – на агар Чапека или сусло-агар, а также (грубые корма) во влажные камеры со средой Ван-Итерсона в соответствии с ГОСТ 18057-88 «Корма грубые. Метод выделения микроскопических грибов» и ГОСТ 13496.6-2017 «Комбикорма. Метод выделения микроскопических грибов».

Подготовка к исследованию. Для предупреждения загрязнения посевов применяемая посуда (чашки Петри, пипетки и др.) и инструменты должны быть стерильными. Стерилизацию чашек, завернутых предварительно в бумагу, а также пипеток проводят в сушильном шкафу при температуре +140...+160°C в течение 2 часов.

Все процессы, связанные с разливкой питательных сред в чашки Петри, подготовкой корма для посева, с посевом корма, проводят в стерильных условиях (около пламени горелки в специальном боксе). Перед посевом проводят контроль зараженности воздуха в боксе спорами грибов седиментационным методом, для чего 1-2 чашки со средами оставляют открытыми в течение 3 минут.

Стерилизацию бокса, рабочего помещения, термостата, холодильника проводят парами формальдегида с последующей нейтрализацией аммиаком (на 1 м³ объема помещения расходуют 45 мл 40%-ного формальдегида, к которому добавляют 20 мл воды и 30 г перманганата калия). Дезинфекцию проводят в течение 2 часов, после чего для нейтрализации паров формалина применяют нашатырный спирт (из расчета 50% от объема затраченного формалина).

Перед посевом питательный агар расплавляют в водяной бане, затем после охлаждения до температуры +45...+50°C для подавления сопутствующей бактериальной флоры добавляют антибиотики (50000 ЕД пенициллина и 100000 ЕД стрептомицина на 1 л среды).

Приготовленный агар в жидком виде разливают в стерильные чашки Петри и дают застыть на горизонтальной поверхности. Слой агара должен быть не менее 0,5 см.

Для приготовления влажной камеры на дно чашки Петри помещают тонкий слой ваты, на которую кладут кружок фильтровальной бумаги по диаметру чашки (вместо ваты можно положить несколько кружков фильтровальной бумаги), после чего стерилизуют в сушильном шкафу.

Перед посевом в чашки добавляют среду Ван-Итерсона в таком количестве, чтобы хорошо увлажнить вату и фильтровальную бумагу, но не создать избытка влаги (на чашку с диаметром 10-12 см расходуют около 5 мл среды).

Выделение грибов из зерна. Заражение зерен грибами может быть поверхностным (заспорение), когда элементы гриба (споры, частицы гиф и др.) присутствуют на поверхности зерна, не развиваясь в нем, и глубинным (поражение), когда гриб развивается в субэпидермальных частях зерна. Выявляют как субэпидермальную, так и поверхностную флору грибов.

Зерна раскладывают в чашках Петри на поверхности питательной среды по 10 штук таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом, стараясь не передвигать их, чтобы предотвратить появление колоний, берущих начало не от зерен и рассматриваемых при учете как загрязнение.

Для выявления субэпидермальной микофлоры, преимущественно обуславливающей качество корма, перед посевом проводят дезинфекцию (обработку) зерен 3%-ным раствором формальдегида или водным раствором сулемы в концентрации 1:1000 при экспозиции в течение 1,5-2 минут.

Для этого зерна, завернутые в марлевую салфетку размером 10×10 см, помещают в стаканчик с дезинфицирующим раствором. После окончания дезин-

фекции их промывают стерильной водой (при дезинфекции сулемой 3-кратно, при использовании формальдегида – 1-кратно с обязательным добавлением для его нейтрализации 2-3 капли 5%-ного раствора аммиака к 50 мл воды).

Поверхностную дезинфекцию зерен можно проводить в течение 1 минуты в 2%-ном растворе натрия гипохлорита с последующей 2-кратной промывкой зерен стерильной водой. Промывную воду сливают, затем, слегка раздвинув пинцетом марлю, раскладывают зерна на агаровую пластинку. Число посеянных зерен должно быть не менее 50 шт.

Выявление поверхностной микофлоры, необходимое для контроля зерна на зараженность патогенным грибом *Aspergillus fumigatus*, проводят путем раскладывания зерен по поверхности среды без предварительной поверхностной дезинфекции. Число посеянных зерен должно быть не менее 20 шт.

Выделение грибов из концентрированных кормов (кроме зерна) и комбикормов проводят путем посева разбавленных взвесей кормов на питательные среды (метод разлива), инкубации посевов в термостате при определенных условиях и выявлении роста и спороношения грибов, контаминирующих корма.

Размол пробы гранулированного корма производят на лабораторной мельнице до прохода через сито с размером стороны квадратной ячейки 1 мм.

Для приготовления разведений в колбу со 100 мл стерильного 0,1%-ного раствора поверхностно-активного вещества (ОП-7, ОП-10, Твин-80) в дистиллированной воде (растворитель) помещают $10 \pm 0,01$ г подготовленного корма. Полученную взвесь с соотношением корма и растворителя 1:10 (взвесь №1) встряхивают в течение 15-20 минут на шуттель-аппарате.

Для получения взвеси №2 (соотношение корма и растворителя 1:100) стерильной градуированной пипеткой берут 1 мл взвеси №1 и помещают в пробирку с 9 мл растворителя (конец пипетки следует отрезать для свободного прохождения частиц корма, после чего пипетка должна быть откалибрована на 1 мл).

Из полученной взвеси №2 готовят таким же образом взвесь №3 (соотношение корма и растворителя 1:1000) и, если необходимо, то из взвеси №3 готовят взвесь №4 (соотношение корма и растворителя 1:10000).

Перед взятием очередной порции взвеси, как для получения дальнейшего разведения, так и для посева, необходимо новой стерильной пипеткой сначала тщательно перемешать взвесь.

Степень разведения основной взвеси зависит от органолептических показателей корма (от наличия признаков порчи): потемнения, побурения, грибного налета различного цвета (черный, белый, сероватый и др.), слежавшихся пластов, наличия головни и спорыньи, наличия затхлого, плесневого, гнилостного и других запахов, не свойственных данному корму.

При отсутствии признаков порчи в корме для посева используют взвесь №3. Если в корме присутствуют признаки порчи, то для посева используют взвесь №4.

Посев проводят сразу же после приготовления последней взвеси, не давая ей отстояться. 1 мл взвеси равномерно распределяют по всей поверхности питательной среды, слегка наклоняя чашки Петри в разные стороны.

Для идентификации различных микроскопических грибов применяют агар Чапека (для *Aspergillus* и *Penicillium*) и сусло-агар (для *Mucor* и *Fusarium*).

Количество засеянных чашек зависит от выбранной степени разбавления: при посеве взвеси №3 используют 5 чашек, а при посеве взвеси №4 используют 8 чашек.

Посевы инкубируют в термостате при температуре +22...+25°C в течение 5-7 суток. Рост и спороношение большинства грибов, контаминирующих корм, становится заметным уже через 2-3 суток.

Выделение грибов из грубых кормов. Исследуемые грубые корма нарезают ножницами кусочками длиной около 2 см в стерильную чашку Петри (перед измельчением корма инструменты стерилизуют над пламенем горелки).

Измельченные корма переносят пинцетом, простерилизованным над пламенем горелки, на поверхность питательной среды в чашки Петри (отрезки корма не должны соприкасаться).

Каждая проба высевается на агар Чапека или сусло-агар и во влажную камеру (для выявления грибов-целлюлозоразрушителей). В 3 чашки Петри с агаром раскладывают по 10 отрезков корма, в 3 влажные камеры помещают не менее 90 отрезков (по 30 в каждую чашку).

Посевы инкубируют в термостате при температуре +22...+25°C в течение 5-7 суток. Рост и спороношение большинства грибов, контаминирующих грубые корма, становится заметным уже через 2-3 суток.

5.2.2. Выделение грибов в чистые культуры и их идентификация

Родовую, а в ряде случаев и видовую принадлежность грибов устанавливают в первичном посеве, однако часто вид гриба определяют после выделения его в чистую культуру, для чего применяют 2 метода: метод непосредственного пересева и метод деления.

Получение чистых культур необходимо для дальнейшего изучения их токсигенности.

Метод непосредственного пересева применяют в том случае, если в первичном посеве выросли изолированные колонии. Пересевают маленький кусочек мицелия или часть колонии, для чего осторожно берут их микологическим крючком и помещают на поверхность питательной среды.

При наличии обильного спороношения (например, у грибов из родов *Aspergillus* и *Penicillium*) иглой, предварительно увлажненной в агаре той чашки или пробирки, куда будет проведен посев, лишь касаются спороносящей поверхности колонии и переносят минимальное количество спор.

Пересев грибов с целью их идентификации проводят на агаровые пластинки в чашки Петри, а с целью поддержания культур для длительного хранения их в качестве эталонов (для длительного поддержания культур их пересевают 1 раз в год, хранят при температуре +4...+5°C; ватные пробки при этом должны быть защищены колпачками из фильтровальной бумаги) или для дальнейшего изучения их токсичности – на скошенный агар в пробирки.

При использовании пробирок материал помещают в нижней трети косяка, при использовании чашек – обычно в 1 или 3 точках. В последнем случае чаш-

ки во время инокуляции, а также дальнейшей инкубации держат кверху дном для предотвращения рассеивания спор по всей агаровой пластинке.

Метод разделения применяют в тех случаях, если колонии загрязнены другими грибами или бактериями, что устанавливают обычно визуально.

С этой целью готовят 3-4 последовательных разведения взвеси спор гриба в стерильном 0,1%-ном растворе Твин-80 в воде и высевают из 1-2 последних разведений по 1 мл на поверхность агара в чашки Петри, распределяя взвесь шпателем или наклоняя чашку в разные стороны. При наличии обильного спороношения разделение проводят с помощью посева – коснувшись стерильной влажной иглой или крючком ограниченного участка спороносящей поверхности, проводят ею штрихом по поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Штриховой посев особенно эффективен, если контаминантом являются бактерии.

Для **идентификации различных групп грибов** применяют определенные дифференциально-диагностические среды: для грибов из рода *Aspergillus* и рода *Penicillium* – агар Чапека и мальц-агар, для грибов из рода *Mucor* – сусло-агар, для грибов из рода *Fusarium* – сусло-агар и среда Билай.

Для более полного изучения культурально-морфологических свойств грибов используют и другие специальные среды, указанные в соответствующих пособиях по определению грибов.

Культивируют посева при температуре +22...+25°C. Сроки культивирования различны, в зависимости от рода и вида гриба, до образования характерного спороношения.

После окончания культивирования проводят макро- и микроскопическое исследование культур.

При *макроскопическом исследовании* признаков грибов рассматривают колонии на месте их роста, учитывают цвет, форму, консистенцию колонии, характер роста, форму растущего края, наличие или отсутствие склероциев, пигмента, цвет его, степень развития воздушного мицелия.

Микроскопическое исследование проводят после приготовления препарата. Для этого маленькие частицы мицелия, желательно со спороношением, взятые микологическим крючком (из пробирок) или препаровальной иглой (из чашки) как из молодых (с периферии), так и более старых (у центра) частей колоний, помещают на предметное стекло в небольшую каплю фиксирующей жидкости для препаратов, при этом используют вторую иглу, с помощью которой осторожно снимают и расправляют материал.

Покрывают препарат покровным стеклом и слегка надавливают на него, стараясь не загрязнить сверху (в случае если по краям покровного стекла появляется избыток жидкости, его следует убрать с помощью кусочка фильтровальной бумаги).

Фиксирующей жидкостью, наиболее пригодной для приготовления препаратов грибов из родов *Aspergillus*, *Penicillium* и ряда других, является лактофенол Аммана (1 часть дистиллированной воды + 1 часть молочной кислоты + 2 части глицерина + 1 часть фенола). Прежде чем поместить материал в эту жид-

кость, его следует кратковременно (до 30 секунд) обработать 70° этиловым спиртом для смачивания спор и удаления их избытка.

Для изучения грибов из рода *Fusarium* и некоторых других используют жидкость, состоящую из равных частей дистиллированной воды, этилового спирта и глицерина, при этом исследуемый материал спиртом не обрабатывают. Для улучшения видимости контуров конидий и перегородок в них к 100 мл указанной жидкости добавляют 0,5-1 мл 0,01%-ного водного или спиртового раствора метиленового синего.

Оба названных выше фиксатора позволяют хранить препарат сравнительно долгое время; для увеличения сроков хранения края покровного стекла заливают парафином или лаком.

Для предотвращения загрязнения воздуха помещения спорами грибов, препараты готовят с соблюдением правил асептики.

С помощью малого (объектив $\times 8$ или $\times 10$), а затем большого (объектив $\times 40$) увеличения микроскопа изучают препараты и, пользуясь специальными определителями с микологическими ключами, идентифицируют гриб.

Культуральные и морфологические свойства отдельных токсикогенных грибов представлены в приложениях А – Г.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ КУЛЬТУР ГРИБОВ

В случае установления токсичности кормов при микологических исследованиях, а также для выявления роли грибов в этиологии микотоксикозов определяют токсичность культур грибов ускоренным методом с использованием простейших (*Paramecium caudatum*), а также методом кожной пробы на кролике. Результаты используют при оценке санитарного качества кормов и выборе способов их обезвреживания.

6.1. Определение токсичности культур грибов на простейших *Paramecium caudatum*

Простейшие *Paramecium caudatum* (инфузории-туфельки) относятся к царству *Chromista*, типу *Ciliophora* (реснитчатых инфузорий), классу *Oligohymenophorea*, отряду *Peniculida*, семейству *Parameciidae*. Они относятся к биологическим тест-моделям 2-го порядка.

Пресноводные инфузории *Paramecium caudatum* (рисунок 11) имеют широкое географическое распространение, обладают коротким жизненным циклом (размножение инфузорий *P. caudatum* происходит путем продольного деления взрослого организма пополам в течение 1 суток; темп деления инфузорий – 1-2 особи в сутки) и требуют минимум пространства и оборудования для культивирования и проведения тестирования. Тест-организмы могут культивироваться постоянно в лабораторных условиях.



Рисунок 11 – *Paramecium caudatum*
[bigcommerce.com]

Метод применяется для ориентировочного определения токсичности грибов, в первую очередь таких, как *Stachybotrys alternans*, *Dendrodochium toxicum*, виды рода *Fusarium*, и дает возможность выявлять водорастворимые токсические вещества.

Исходный материал для культивирования тест-организмов *P. caudatum* получают в лабораториях, занимающихся тестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности (или из коллекций).

Тест-организмы (пресноводные инфузории *P. caudatum*) допускается выделять из природных водоемов. Выделение культуры проводят следующим способом: банкой вместимостью 1 л у самого берега зачерпывают воду с илом и как можно быстрее под микроскопом (увеличение в 100 раз) просматривают пробы. Обнаруженных *P. caudatum* последовательно переносят в микроаква-

риумы объемом сначала со смесью среды пробы и культуры в соотношении 2:1, затем увеличивают содержание культуральной жидкости в микроаквариумах через каждый час и помещают в чистый минеральный раствор.

Для определения инфузорий используют «Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР» (1977).

Тест-организмы культивируют на минеральной среде Лозина-Лозинского и содержат в климатостате, инкубаторе или в помещении с регулируемой температурой $+25\pm 2^\circ\text{C}$. При этом обеспечивают естественное или искусственное освещение так, чтобы соблюдались следующие периоды: 16 часов – воздействие света при освещенности 500-1000 лк, 8 часов – без воздействия света (в темноте). Тест-организмы *P. caudatum* необходимо защищать от воздействия прямого солнечного света.

Тест-организмы и минеральная среда, в которой проводят их культивирование, должны содержаться в емкостях только из стекла. Емкости, применяемые для культивирования тест-организмов, должны быть оснащены свободными или перфорированными крышками, чтобы уменьшить испарение, но обеспечить газообмен. Емкости тщательно моют при каждой замене минеральной среды.

В качестве корма используют сухие пекарские дрожжи, которые вносят в чашку Петри по 1 грануле (сухие пекарские дрожжи, предназначенные для кормления тест-организмов, хранят при температуре $+20\dots+25^\circ\text{C}$ не более 1 года). Можно в качестве корма для инфузорий использовать очищенный дробленый рис, при этом добавляют 3 зернышка в чашку Петри на объем 30 мл питательной среды.

Рекомендуется регулярно просматривать состояние маточной культуры *P. caudatum*, пересаживать на свежую минеральную среду и кормить через 3 суток.

Для экспериментов используют клональные культуры инфузорий *P. caudatum*. Клон выводят следующим способом: 1 особь освобождают от посторонней микрофлоры путем последовательной пересадки через несколько микроаквариумов с минеральной средой и оставляют для размножения. Когда количество разделившихся инфузорий становится достаточным (30-40 особей), их пересаживают в емкость со средой Лозина-Лозинского. Полученную таким способом культуру инфузорий *P. caudatum* адаптируют к заданной температуре в течение 3-4 недель при температуре $+24\dots+25^\circ\text{C}$ в термостате, при $+12\dots+13^\circ\text{C}$ и $+4\dots+5^\circ\text{C}$ – в холодильниках (колебания температуры не должны превышать $\pm 1^\circ\text{C}$).

Для поддержания стандартных условий культивирования пользуются культурой в стационарной фазе роста.

Культивирование инфузорий проводят следующим способом: в чашку Петри вместимостью 50 мл с минеральной средой Лозина-Лозинского (объем среды 30 мл) вносят 100 особей инфузорий *Paramecium caudatum* из маточной культуры и добавляют корм (1 гранулу сухих дрожжей на данный объем). Выращивают инфузории (при постоянной температуре $+24\pm 2^\circ\text{C}$ и освещенности 500-1000 лк) в течение 3 суток. Через 3 суток, когда плотность инфузорий *P.*

caudatum обычно достигает максимума, культуру инфузорий пастеровской пипеткой пересаживают в чистую чашку Петри с минеральной средой Лозина-Лозинского в количестве 100 особей на 30 мл и снова добавляют корм. Таким способом получают культуру инфузорий *P. caudatum*, предназначенную для культивирования. Культура инфузорий очень долго находится в экспоненциальной фазе роста. Стационарная фаза достигается при культивировании свыше 2 месяцев.

Допускается проводить культивирование инфузорий в термобоксе, изготовленном из оргстекла, с помощью нагревательного элемента, термодатчика и терморегулятора, избегая попадания прямых солнечных лучей, или в термостате, но в этом случае необходимо установить маломощную лампу дневного света с реле времени, регулирующим освещением: 12 часов – свет, 12 часов – темнота.

Подготовка к тестированию. Для тестирования используют суточную культуру инфузорий *Paramecium caudatum* (синхронизированная культура), которую получают в лаборатории следующим способом: в чашку Петри вместимостью 50 мл с минеральной средой Лозина-Лозинского (объем 30 мл) из емкости с маточной культурой помещают 100 взрослых особей *P. caudatum*, кормят и выдерживают в течение 1 суток; затем молодь отбирают пастеровской пипеткой с укороченным концом и помещают в чистую чашку Петри с минеральной средой Лозина-Лозинского; после чего суточную (синхронизированную) культуру используют при тестировании.

Тестирование проб с испытуемыми тест-организмами проводят в чашках Петри вместимостью на 25 мл из стекла или в микроаквариумах (блок-камерах) с рабочим объемом 4 мл из органического стекла, при этом плотность посадки на объем 10 мл должна составлять 10 шт. тест-организмов, а на объем 4 мл – 5 шт.

Микроаквариумы из органического стекла представляют собой 2 склеенные между собой пластины размером 20-21×7-8 см. В верхней пластине толщиной примерно 1 см просверливают отверстия диаметром 3 см, нижняя пластина толщиной примерно 0,5 см служит дном. В блоке имеется 12 камер (лунок), которые расположены в 2 ряда по 6 в каждом. В каждую лунку вносят по 5 тест-организмов. 5 рядов используют для различных концентраций, а 6-й – для контроля. Сверху микроаквариум закрывают стеклянной пластинкой соответствующего размера, что препятствует испарению раствора.

Суточные инфузории *P. caudatum* при тестировании не кормят.

Для культивирования маточной культуры инфузорий *P. caudatum* удобны небольшие стеклянные емкости (например, чашки Петри) вместимостью 50 мл (плотность посадки – 100 особей на 30 мл). Появившуюся молодь в необходимом количестве отсаживают в отдельные емкости. Когда вновь появившиеся тест-организмы начинают размножаться, их снова пересаживают в чистые емкости с минеральной средой. Каждое поколение маркируют и на емкости ставят дату.

При культивировании и проведении тестирования необходимо поддерживать непрерывное размножение тест-организмов, учитывая особенности биологического цикла их развития.

Длительное культивирование тест-организмов в лабораторных условиях позволяет устанавливать пределы изменчивости основных биологических показателей в зависимости от сезона. В оптимальных условиях содержания выживаемость тест-организмов не зависит от времени года. Длительность культивирования тест-организмов в лаборатории в оптимальных условиях не влияет на результаты опытов.

Инфузории *P. caudatum* предпочитают альфа-мезосапробные условия. Температурный оптимум лежит в пределах +24...+28°C, pH – 6,5-7,5.

Проведение испытания. Из культур грибов в первичных посевах на агаровых средах готовят водные экстракты. Для этого колонии грибов снимают с поверхности агара, освобождают от него, помещают в пробирки, измельчают до кашицеобразного состояния, заливают дистиллированной водой нейтральной реакции в соотношении 1:1 по объему, перемешивают и оставляют при температуре +4...+10°C на 24 часа.

2 капли экстракта из культуры гриба с помощью пастеровской пипетки наносят на предметное стекло и добавляют 1 каплю среды с простейшими *Paramecium caudatum*. Отмечают время начала опыта и под микроскопом (объектив ×8 или ×10) наблюдают за поведением парамеций. Если в течение 3-5 минут гибель простейших не наступит, предметное стекло помещают в чашку Петри на кружок фильтровальной бумаги, смоченный водой, что предотвращает подсыхание капель.

Для быстрого определения токсичности ряда грибов, таких как *Stachybotrys alternans*, *Fusarium sporotrichioides*, *Dendrodochium toxicum*, берут кусочек колонии гриба, выросшего в чашке Петри при первичном посеве корма, переносят на предметное стекло шпателем или иглой, измельчают, заливают несколькими каплями дистиллированной воды и смешивают. Через 2 часа пленку удаляют или отодвигают в сторону, вносят каплю среды с простейшими и ведут наблюдение.

Обработка результатов. Критерием для определения чувствительности парамеций к токсическим веществам служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели простейших, которую констатируют на основании прекращения их движения, часто сопровождающегося деформацией и распадом. Если гибели парамеций не отмечается, то наблюдение за ними проводят не более 2 часов. В случаях, когда хотя бы часть парамеций за это время прекращает движение, наблюдение продолжают вплоть до момента гибели всех простейших. Многие метаболиты с острой токсичностью вызывают гибель простейших в период от 1 до 20-30 минут, а со слабой токсичностью – до 1-2 часов (иногда несколько дольше).

6.2. Определение токсичности культур грибов методом кожной пробы на кролике

В матрицы емкостью 1,5 л или конические колбы объемом 1000 мл помещают 200 г раздробленного зерна (кукуруза, рис, ячмень, пшеница и др.) или 30-50 г грубого корма, увлажняют (к зерну добавляют воду в количестве 100 мл

для культивирования грибов *Aspergillus* и *Fusarium* и 200 мл для культивирования грибов *Penicillium*, а к грубому корму – 20 мл) и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм. в течение 30 минут.

Приготовленную среду засевают суспензией спор испытуемого гриба, предварительно выделенного в чистую культуру из первичного посева (суспензию получают путем добавления в пробирку с культурой 3-5 мл физиологического раствора, содержащего 0,1% Твин-80, ОП-7 или ОП-10, и встряхивания ее для отделения спор). Колбы с посевами тщательно встряхивают.

Культивируют грибы при температуре +25...+27°C в течение 10 дней.

Для накопления микотоксинов грибами из рода *Fusarium* (Т-2 токсин, Ф-2 токсин) культуры дополнительно выдерживают при пониженной температуре (+5...+7°C) в течение 15-30 суток.

Накопление токсических веществ в среде идет параллельно с ростом и развитием грибов.

По окончании сроков культивирования культуру извлекают из сосудов, помещают в пакеты из фильтровальной бумаги и подсушивают при температуре +40...+45°C, после чего измельчают.

Кожную пробу на кролике ставят и учитывают так же, как при определении токсичности кормов.

Можно применять **упрощенный способ** определения токсичности чистых культур грибов методом кожной пробы на кролике. Для этого снимают мицелиальную пленку гриба, выросшего на питательной среде, растирают до кашицеобразного состояния и стеклянной палочкой или шпателем наносят на кожу кролика.

7. ИНДИКАЦИЯ МИКОТОКСИНОВ В КОРМАХ

Для определения содержания микотоксинов наиболее часто используются хроматографические методы (газожидкостная хроматография совместно с масс-спектрометрией, высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-спектрометрической, флуоресцентной или масс-спектрометрической детекцией) с различными вариантами пробоподготовки, а также более экономичные скрининговые методы.

Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии обеспечивает высокую точность результатов, позволяет определять несколько микотоксинов одного или разных классов, используется в качестве подтверждающего метода, но требует наличия квалифицированных кадров и дорогостоящего оборудования.

Скрининг-методы отличаются быстротой и удобны для проведения серийных анализов, позволяют быстро и надежно разделять загрязненные и незагрязненные образцы. К ним относятся такие широко распространенные методы, как методы тонкослойной хроматографии (ТСХ) для одновременного определения до 30 различных микотоксинов, метод трехфазного иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохимические методы (ИХМ), обладающие высокой селективностью благодаря применению специфических антител. Хотя скрининговые методы с использованием экспресс-тестов не столь точны, но позволяют оперативно определять наличие микотоксинов и оперировать большими выборками проб.

В последние годы для определения содержания микотоксинов активно применяются молекулярно-генетические методы. Из образца зерна делается мука, а из нее выделяется ДНК. В этом образце общей ДНК есть ДНК и растений, и вирусов, и бактерий, и грибов, которые там присутствуют. Современные методы позволяют определить, какое количество ДНК целевого объекта присутствует в этом образце общей ДНК.

Арбитражными методами количественного определения микотоксинов являются: газожидкостная хроматография (для Т-2 токсина); высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с использованием УФ-фотометрического детектора (для дезоксиниваленола), с использованием флуоресцентного детектора (для афлатоксинов и зеараленона). Иммуноферментный анализ обычно используется для мониторинга наличия микотоксинов выше определенного уровня (или их отсутствия) в испытуемом образце.

Принципы хроматографии, получившие доминирующее развитие, весьма универсальны, благодаря чему они оказались пригодны для изучения объектов самой различной природы.

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между 2 фазами – подвижной и неподвижной.

Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий

через неподвижную фазу, иногда под давлением. Приборы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяют определить в пищевых продуктах и кормах содержание микотоксинов, антибиотиков, алкалоидов, консервантов, гистамина и других токсичных компонентов.

В современной жидкостной хроматографии используют приборы различной степени сложности – от наиболее простых систем до хроматографов высокого класса, снабженных различными дополнительными устройствами для количественного измерения содержания каждого компонента. Высокоэффективная жидкостная хроматография является наиболее перспективным аналитическим вариантом классической колоночной хроматографии в современном приборостроении. Этот метод позволяет реализовать почти все механизмы разделения, применяемые в хроматографии. При этом, независимо от механизма разделения, подвижной фазой в ВЭЖХ является жидкость.

Хроматографические методы имеют следующие преимущества:

- значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции;
- возможность селективного разделения широкого круга веществ;
- на разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые расширяют возможности хроматографии.

В состав любого хроматографа входят 5 обязательных составных частей:

- а) насос для подачи подвижной фазы через колонку;
- б) дозатор для введения пробы в колонку;
- в) разделительная колонка (основа хроматографа);
- г) детектор (устройство для получения аналитического сигнала, пропорционального концентрации компонента);
- д) система обработки (преобразователь аналитического сигнала в форму, удобную для восприятия человеком (или системой автоматического управления)).

Блочно-модульный принцип построения позволяет производить комплектацию хроматографических систем для решения конкретных задач.

Для определения микотоксинов в сельскохозяйственной и пищевой продукции с использованием метода ВЭЖХ разработаны соответствующие ТНПА:

- ГОСТ 28001-88 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А»;
- ГОСТ 30711-2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В1 и М1»;
- ГОСТ 31691-2012 «Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение содержания зеараленона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»;
- ГОСТ 31748-2012 (ISO 16050:2003) «Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1

- и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии»;
- ГОСТ 32251-2013 (ISO 17375:2006) «Корма, комбикорма. Метод определения содержания афлатоксина В1»;
 - ГОСТ 32587-2013 «Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»;
 - ГОСТ 33780-2016 «Продукты пищевые, корма, комбикорма. Определение содержания афлатоксина В1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением очистки на оксиде алюминия»;
 - ГОСТ 34140-2017 «Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

Метод тонкослойной хроматографии применяется для разделения, оценки чистоты и идентификации органических соединений. Он основан на применении пластин с нанесенной неподвижной фазой и подвижной фазой (растворитель). Идентификация анализируемого вещества проводится при одновременном внесении на пластину экстракта образца и стандартных растворов с известной концентрацией. Различные соединения в смеси продвигаются по пластине с различной скоростью вследствие различия в закономерностях их разделения между подвижной жидкой и неподвижной фазами. На этом принципе основано разделение веществ в смеси экстракта. Флуоресцирующие вещества выявляются в УФ-свете, все остальные – с помощью специфических реагентов.

Совершенствование метода путем уменьшения толщины слоя неподвижной фазы (до 100 мкм) и величины частиц (до 5 мкм) привело к более быстрому и лучшему разделению веществ. Этот метод получил название **высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)**.

Методы тонкослойной хроматографии доступны почти для всех микотоксинов. Обнаружение и специфическая идентификация разработаны для каждого отдельного микотоксина с использованием молекулярных свойств или реакций трансформации веществ реагентов.

К недостаткам тонкослойной хроматографии относятся:

- малая производительность;
- концентрация анализируемого вещества должна быть в диапазоне 0,01-0,1%;
- использование токсичных и летучих веществ в качестве растворителя.

Для анализа большого количества образцов представляют интерес эффективные иммунохимические методы анализа, основанные на высокоспецифическом взаимодействии антигена и антитела. Имея невысокую стоимость и относительно простоту, иммуноанализ позволяет проводить количественный или качественный скрининг множества образцов за короткое время.

Наиболее распространенным скрининговым методом является **твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)**, основанный на высокоспецифичной реакции антиген-антитело, детектирование которой осуществляется за счет введения ферментативной метки с последующим ее выявлением с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Твердой фазой в иммуноферментном анализе обычно служит поверхность лунки микропланшета.

Из-за разнообразия объектов, многообразия принципов связывания и условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода, имеющих как принципиальные, так и второстепенные отличия. Обычно рассмотрение методов ИФА осуществляется с позиций разделения на гетерогенные и гомогенные, т. е. по принципу проведения всех стадий анализа с участием твердой фазы или же только в растворе.

Метод ИФА (ELISA) относится к группе иммунохимических методов биохимического исследования и обладает определенными преимуществами:

- оперативность;
- высокая производительность (на одном планшете проводится несколько десятков анализов одновременно);
- простота пробоподготовки и проведения измерений;
- низкая стоимость анализа по сравнению с хроматографическими методами;
- малый объем тестируемого образца.

Иммуноферментный анализ обычно используется для мониторинга наличия микотоксинов выше определенного уровня (или их отсутствия) в испытуемом образце.

Для определения содержания микотоксинов (афлатоксина В₁, охратоксина А, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина В₁ и др.) в зерновых кормах, зернобобовых кормовых культурах, искусственно высушенных и грубых кормах, продукции комбикормовой промышленности, сырье для производства кормов и кормовых добавках (за исключением кормовых добавок минерального происхождения и продукции органического синтеза) иммуноферментным методом разработан ГОСТ 31653-2012 «Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов».

Иммуноферментный метод основан на измерении содержания микотоксинов в пробах с помощью непрямого твердофазного конкурентного ИФА рабочих растворов экстрактов (рисунок 12).

Непрямой ИФА основан на способности микотоксинов взаимодействовать со специфичными антителами в условиях конкуренции с белковым конъюгатом микотоксина, нанесенным на поверхность ячеек планшета, – твердофазным антигеном.



Рисунок 12 – Основные этапы иммуноферментного метода определения микотоксинов в кормах [ГОСТ 31653-2012]

Полученные в результате определения методами иммуноферментного анализа (ИФА) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) данные о содержании конкретных микотоксинов в кормах должны быть сопоставлены с требованиями «Ветеринарно-санитарных правил обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов», утвержденных постановлением МСХ и П РБ №10 от 10 февраля 2011 г. (Приложение И).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агольцов, В. А. Ветеринарная микотоксикология : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности (квалификация ветеринарный врач) «Ветеринария», направлению подготовки (квалификация бакалавр) «Зоотехния» / В. А. Агольцов, О. М. Попова, С. В. Ларионов ; Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова. – Саратов : НППСИП «Приволжская книжная палата», 2015. – 101 с.
2. Буклагин, Д. С. Методы определения микотоксинов в сельскохозяйственной продукции и кормах / Д. С. Буклагин // Техника и технологии в животноводстве. – 2020. – №4 (40). – С. 57–67.
3. Госманов, Р. Г. Микология и микотоксикология : монография / Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин, Ф. М. Нургалиев. – Санкт-Петербург : Лань, 2019. – 168 с.
4. Кисленко, В. Н. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / В. Н. Кисленко. – Москва : КолосС, 2005. – 232 с.
5. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология : учебник для студентов высших аграрных учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария» / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2014. – 623 с.
6. Колычев, Н. М. Руководство по микробиологии и иммунологии : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Ветеринария», «Ветеринарно-санитарная экспертиза» / Н. М. Колычев, В. Н. Кисленко. – 2-е изд. – Москва : ИНФРА-М, 2016. – 254 с.
7. Кононенко, Г. П. Система микотоксикологического контроля объектов ветеринарно-санитарного и экологического надзора : дис. ... д-ра биологических наук : 16.00.03 / Г. П. Кононенко. – Москва, 2005. – 48 с.
8. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению микотоксикозов животных. – Москва : ФГБНУ «Росинформагротех», 2017. – 68 с.
9. Микотоксикозы (биологические и ветеринарные аспекты) / А. В. Иванов [и др.]. – Москва : Колос, 2010. – 392 с.
10. Толкач, Н. Г. Ветеринарная токсикология : учебное пособие для студентов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / Н. Г. Толкач, В. В. Петров, М. П. Кучинский ; ред. Н. Г. Толкач. – Минск : ИВЦ Минфина, 2014. – 469 с.
11. Тутельян, В. А. Микотоксины / В. А. Тутельян, Л. В. Кравченко. – Москва : Медицина, 1985. – 320 с.
12. Bennett, J. W. Mycotoxins / J. W. Bennett, M. Klich // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 16 (3). – P. 497–516.
13. Diaz, D. Mycotoxins and mycotoxicosis / D. Diaz. – Moscow : Pechatniygorod, 2006. – 382 p.

ТНПА

1. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов (Утв. постановлением МСХ и П РБ №10 от 10 февраля 2011 г.).
2. ГОСТ 10852-86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб».
3. ГОСТ 10854-2015 «Семена масличные. Методы определения сорной, масляной и особо учитываемой примеси».
4. ГОСТ 10967-2019 «Зерно. Методы определения запаха и цвета».
5. ГОСТ 12430-2019 «Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях».
6. ГОСТ 13496.0-2016 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб».
7. ГОСТ 13496.10-2017 «Комбикорма. Метод определения содержания спор головневых грибов».
8. ГОСТ 13496.11-74 «Зерно. Метод определения содержания спор головневых грибов».
9. ГОСТ 13496.13-2018 «Комбикорма. Методы определения запаха, зараженности вредителями хлебных запасов».
10. ГОСТ 13496.5-2018 «Комбикорма. Метод определения спорыньи».
11. ГОСТ 13496.6-2017 «Комбикорма. Метод выделения микроскопических грибов».
12. ГОСТ 13586.3-2015 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб».
13. ГОСТ 13979.0-86 «Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб».
14. ГОСТ 13979.4-68 «Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Методы определения цвета, запаха, количества темных включений и мелочи».
15. ГОСТ 17681-82 «Мука животного происхождения. Методы испытаний».
16. ГОСТ 18057-88 «Корма грубые. Метод выделения микроскопических грибов».
17. ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия».
18. ГОСТ 27668-88 «Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб».
19. ГОСТ 28001-88 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А».
20. ГОСТ 30483-97 «Зерно. Методы определения общего и фракционного содержания сорной и зерновой примесей; содержания мелких зерен и крупности; содержания зерен пшеницы, поврежденных клопом-черепашкой; содержания металломагнитной примеси».
21. ГОСТ 30711-2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В1 и М1».
22. ГОСТ 31339-2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб».

23. ГОСТ 31653-2012 «Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов».
24. ГОСТ 31691-2012 «Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение содержания зеараленона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».
25. ГОСТ 31748-2012 (ISO 16050:2003) «Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии».
26. ГОСТ 32251-2013 (ISO 17375:2006) «Корма, комбикорма. Метод определения содержания афлатоксина В1».
27. ГОСТ 32587-2013 «Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».
28. ГОСТ 33780-2016 «Продукты пищевые, корма, комбикорма. Определение содержания афлатоксина В1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением очистки на оксиде алюминия».
29. ГОСТ 34140-2017 «Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».
30. ГОСТ 4808-87 «Сено. Технические условия».
31. Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов / Гос. агропром. ком. СССР, Гл. упр. ветеринарии (Утв. 25.02.1985). – М. : [Б. и.], 1986. – 67 с.
32. ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна».

При оформлении обложки использована иллюстрация с сайта <https://ykl-res.azureedge.net>

ПРИЛОЖЕНИЕ А

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВИДОВ ГРИБОВ *ASPERGILLUS*

<i>Aspergillus flavus</i> (желтый)		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СҮА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 6-7 см в диаметре, бархатистые по краю до шерстистых хотя бы в центральной части, с белым мицелием и обильным спороношением по всей поверхности, за исключением шерстистых участков, в серо-зеленых, желто-зеленых, оливково-желтых тонах, реже – желтым, затем желто-зеленым. Часто образует склероции – беловатые, затем красно-коричневые до почти черных, иногда покрывающие почти всю колонию (тогда конидиальное спороношение слабовыраженное), шаровидные, 400-1000 мкм в диаметре. Реверс неокрашенный. При +37°C колонии 5,5-6,5 см в диаметре, сходные с колониями, образующимися при +25°C, с оливковым спороношением, иногда с более обильными склероциями.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 5-7 см в диаметре, обычно менее густые, чем на СҮА.
	<i>Смешанно-зерновой агар (МСА)</i>	Телеоморфа образует жесткие склероциевидные стромы с клейстотециями, из которых часто только половина несут аски со спорами.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	Конидиеносные головки обычно 2-ярусные, но иногда преобладают 1-ярусные (на малых вздутиях), с неокрашенной или коричневатой ножкой длиной 400-1000 мкм и более, с шаровидным апикальным вздутием до 20-65 мкм.
	<i>метулы</i>	Покрывают верхние 3/4 вздутия, длиной 6-10 (16) мкм.
	<i>фиалиды</i>	Длиной 6,5-10 мкм (при отсутствии метул – до 14 мкм).
	<i>конидии</i>	Шаровидные и почти шаровидные, часто несколько неодинаковых формы и размеров, мелкошероховатые, редко гладкие, 3,5-5 мкм в диаметре.
	<i>аски</i>	Обычно 8-споровые (но нередко с 1-6 спорами), 19-30 × 16,5-26,5 мкм.
	<i>аскоспоры</i>	Сплюснутые, шаровидные до широкоэллипсоидальных, мелкобугорчатые, с узким экваториальным гребнем, 8-12,5 × 7,5-12 мкм.

<i>Aspergillus candidus</i> (белоснежный)		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СҮА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 1,5-2 см в диаметре, зернистые до шерстистых, с белым мицелием и обильным белым конидиальным спороношением. Реверс бледный или желто-оранжевый. При +37°C колонии 2-2,5 см в диаметре, иногда более крупные.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 1-2,5 см в диаметре, с тускло-коричневым реверсом.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	Конидиеносные головки 2-ярусные, с гладкой или шероховатой ножкой длиной 200-500 мкм и более, с обычно шаровидным апикальным вздутием до 10-40 мкм и более.
	<i>метулы</i>	Покрывают всю поверхность апикального вздутия, длиной 15-20 мкм.
	<i>фиалиды</i>	Длиной 5-9 мкм.
	<i>конидии</i>	В основном шаровидные, гладкие, 2,5-3,5 мкм в диаметре.

<i>Aspergillus fumigatus</i> (дымящий)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Образует 2 типа колоний, которые появляются на 2-3-й день: <ul style="list-style-type: none"> • пушистые (в которых хорошо развит воздушный белый мицелий и слабо представлено конидиальное спороношение, придающее колонии нежно-голубоватый оттенок); • бархатистые (с мицелием в субстрате и обильным конидиальным спороношением, имеющим густую голубовато-зеленую окраску).
	конидиеносцы	Густо скученные, с перегородками или без них, на верхушке с бутыльчатым вздутием в диаметре до 20-30 мкм, в верхней части несущие 1-ярусные конидии, расположенные параллельно оси конидиеносца
Морфологические свойства	метулы	Отсутствуют
	фиалиды	Располагаются на поверхности вздутия конидиеносца, покрывают главным образом его верхнюю часть.
	конидии	В массе темно-зеленые, шаровидные, в диаметре 2,5-3 мкм. Цепочки конидий склеены в колонки.

<i>Aspergillus nidulans</i> (гнездовой)		
Рост на питательных средах	Чапек-дрожжевой агар (СYA)	Колонии на 7-е сутки достигают 4-5 см в диаметре, бархатистые, реже – шерстистые, с белым мицелием и различной интенсивности конидиальным спороношением в зеленоватых тонах. Иногда выделяется фиолетовый растворимый пигмент. Реверс оранжевый, коричневый, фиолетово-коричневый, реже – бледный. Обильны белые клейстотеции, окруженные белыми до желтоватых покровными клетками. При +37°C колонии 5-7 см в диаметре, без воздушного мицелия, с более выраженным преобладанием аскоспорового спороношения.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии на 7-е сутки достигают 3,5-6 см в диаметре, бархатистые или шерстистые, с преобладанием конидиального либо аскоспорового спороношения. Реверс бледный до фиолетово-коричневого.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Конидиеносные головки 2-ярусные, с коричневой ножкой длиной 60-150 мкм, с полушаровидным апикальным вздутием до 8-12 мкм.
	метулы	Покрывают верхнюю половину или меньшую часть апикального вздутия, длиной 5-8 мкм.
	фиалиды	Длиной 5-8 мкм.
	конидии	Шаровидные, шероховатые, 3-3,5 мкм в диаметре.
	клейстотеции	Обильные, белые, затем темно-красные или светло-винные, 100-250 мкм в диаметре.
	аскоспоры	Пурпурно-красные, эллипсоидальные, с 2 сближенными экваториальными гребнями, длиной 3,8-6 мкм.

<i>Aspergillus ochraceus</i> (охряный)		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 4-5 см в диаметре, шерстистые, с белым мицелием и светло-желтым спороношением. Реверс светло-коричневый до темно-коричневого, местами сероватый. Обычно выделяется необильный желтый растворимый пигмент. При +30°C окраска конидий с более выраженным сероватым оттенком, более обильны розоватые или сиреневато-коричневые склероции. При +37°C колонии 1-2 см в диаметре, иногда рост отсутствует; окраска колоний сиреневатая, беловатая, светло-желтая, коричневато-красная, коричневато-серая, реверс серовато-желтый до темно-коричневого.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 3,5-4 см в диаметре, бархатистые, местами шерстистые, спороношение в светло-желтых или серо-желтых тонах. Реверс коричневый, в центре более темный.
	<i>Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 6,5-7 см в диаметре, с бледно-желтым спороношением, часто с обильными розовато-коричневыми склероциями. Реверс колоний часто оливково-коричневый.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	Конидиеносные головки 2-ярусные, длиной 420-2000 мкм и более, с шаровидным апикальным вздутием до 35-65 мкм.
	<i>метулы</i>	Покрывают всю поверхность апикального вздутия, длиной 8-17 мкм.
	<i>фиалиды</i>	Фляговидные, длиной 9-11,5 мкм.
	<i>конидии</i>	Шаровидные, мелкошероховатые, 2,5-4 мкм в диаметре.
	<i>склероции</i>	260-1020 мкм в диаметре.

<i>Aspergillus parasiticus</i> (паразитический)		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 5-7 см в диаметре, бархатистые, с обильным спороношением по всей поверхности в темно-желто-зеленых тонах. Иногда образует склероции – беловатые, затем черные, иногда покрывающие почти всю колонию (тогда конидиальное спороношение слабовыраженное), шаровидные, 400-800 мкм в диаметре. Реверс неокрашенный или коричневый. При +37°C колонии очень широкорастущие, сходные с колониями, образующимися при +25°C, с более насыщенно-зеленым или коричневатым спороношением.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 5-6,5 см в диаметре, обычно менее густые, чем на СУА.
	<i>Смешанно-зерновой агар (МСА)</i>	Телеоморфа образует жесткие склероциевидные стромы с клейстотециями, из которых часто только меньшая часть несет аски со спорами.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	Конидиеносные головки обыкновенно 1-ярусные, но иногда с примесью 2-ярусных, с неокрашенной или коричневатой ножкой длиной 400-800 мкм, с шаровидным апикальным вздутием до 20-35 мкм.
	<i>метулы</i>	Отсутствуют.
	<i>фиалиды</i>	Длиной 7-11 мкм.
	<i>конидии</i>	Шаровидные, одинаковые, грубошероховатые до шиповатых, 4-6 мкм в диаметре.
	<i>аски</i>	Обычно 8-споровые (но нередко с 1-6 спорами), 19-29 × 16-27 мкм.
	<i>аскоспоры</i>	Сплюснутые, шаровидные до широкоэллипсоидальных, мелкобородчатые, с узким экваториальным гребнем, 7-13 × 6,5-12 мкм.

<i>Aspergillus terreus</i> (земляной)		
Рост на питательных средах	Чапек-дрожжевой агар (СYA)	Колонии на 7-е сутки достигают 4-5 см в диаметре, бархатистые, с белым мицелием и обильным бледно-розовато-коричневым или бледно-золотисто-коричневым спороношением. Реверс светло-коричневый до желто-коричневого. При +37°C колонии 5 см и более в диаметре.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии на 7-е сутки достигают 4-6 см в диаметре, несколько менее густые.
	Смешанно-зерновой агар (МСА)	Телеоморфа образует жесткие склероциевидные стромы с клейстотециями, из которых часто только меньшая часть несет аски со спорами.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Конидиеносные головки 2-ярусные, с извилистой ножкой длиной 100-250 мкм, с полушаровидным апикальным вздутием до 10-16 мкм.
	метулы	Покрывают верхнюю половину апикального вздутия, длиной 5-7 мкм.
	фиалиды	Длиной 5-7,5 мкм.
	конидии	Шаровидные, гладкостенные, очень мелкие, 1,8-2,5 мкм в диаметре, собранные в длинные хорошо оформленные колонки.
	клейстотеции	Без покровных клеток, 55-160 × 70-250 мкм, бледно-коричневые.
	аскоспоры	Шаровидные до широкояйцевидных, 4,5-9 × 5,7-9,7 мкм.

<i>Aspergillus ustus</i> (загоревший)		
Рост на питательных средах	Чапек-дрожжевой агар (СYA)	Колонии на 7-е сутки достигают 3-4 см в диаметре, бархатистые, реже – шерстистые, с белым или сероватым мицелием и различной интенсивности спороношением в серых или серо-коричневых тонах. Часто выделяется ярко-желтый растворимый пигмент. Реверс серо-коричневый. При +37°C колонии не развиваются.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии на 7-е сутки достигают 4-5 см в диаметре, бархатистые или шерстистые, обильно спороносящие в оливково-коричневых тонах. Реверс зеленоватый или коричневый.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Конидиеносные головки 2-ярусные, с коричневой ножкой длиной 100-300 мкм, с шаровидным до полушаровидного апикальным вздутием до 7-16 мкм.
	метулы	Покрывают верхние 2/3 апикального вздутия, длиной 4-7 мкм.
	фиалиды	Длиной 5-7 мкм.
	конидии	Шаровидные, шероховатые до грубошероховатых, 3,2-4,5 мкм в диаметре.

<i>Aspergillus versicolor</i> (разноцветный)		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 1,5-2,5 см в диаметре, бархатистые или шерстистые, с белым, бежевым или оранжевым мицелием и различной интенсивности спороношением в серо-зеленых тонах. Иногда выделяется розоватый до винно-красного экссудат. Реверс коричнево-оранжевый до красно-коричневого. При +37°C колонии обычно не растут, реже до 1 см в диаметре, при +5°C не растут (температурный оптимум – около +27°C).
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии на 7-е сутки достигают 1,2-2,5 см в диаметре, бархатистые, обильно спороносящие в тускло-зеленых тонах.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	Конидиеносные головки 2-ярусные, с желтостенной ножкой длиной 300-600 мкм, с незначительным до почти шаровидного апикальным вздутием до 12-16 мкм.
	<i>метулы</i>	Покрывают верхнюю половину или 2/3 апикального вздутия (если оно слабо выражено, то часто только его конец) длиной 5,5-8 мкм.
	<i>фиалиды</i>	Длиной 5-7,5 мкм.
	<i>конидии</i>	Шаровидные, шероховатые до шиповатых, очень мелкие, 2-2,5 мкм в диаметре.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВИДОВ ГРИБОВ *PENICILLIUM* И *TALAROMYCES*

<i>Penicillium camemberti</i>		
Рост на питательных средах	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии белые, пушистые, слабо спорносящие в белых или, реже, сероватых тонах. На 7-е сутки 2-2,5 см в диаметре, с бледным до желтоватого реверсом. Экссудат обычно отсутствует.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии 2,5-4 см в диаметре, с кремовым реверсом.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные до 4-ярусных кисточки, иногда с неправильными ответвлениями различного порядка, длиной 200-500 мкм. Веточки длиной 15-25 мкм.
	метулы	Длиной 7,5-12 мкм.
	фиакиды	Цилиндрические, с длинной широкой шейкой, 10-13 × 2,5-3 мкм.
	конидии	Шаровидные, 3,5-5 мкм в диаметре, гладкостенные.

<i>Penicillium chrysogenum</i> (золотистый)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии быстро растущие, бархатистые, реже – пучковатые, с белым мицелием. Спорношение среднее до обильного, синезеленое до темно-зеленого. Капли экссудата иногда довольно обильные, золотисто-желтые. Водорастворимый пигмент, выделяемый в среду, и реверс колоний также золотисто-желтые. Запах обычно имеется, фруктовый.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии быстро растущие, часто без экссудата.
Морфологические свойства	конидиеносцы	В основном 3-ярусные, также нередко 2- и 4-ярусные, тонкие, гладкостенные, длиной 200-500 мкм.
	метулы	Цилиндрические, гладкостенные, расходящиеся, реже – в сжатых пучках, 8-12×2-2,5 мкм.
	фиакиды	В сжатых пучках по 4-6, цилиндрически-фляговидные, 7-10×2-2,5 мкм.
	конидии	Эллиптические до почти шаровидных, затем шаровидные, гладкостенные, 2,5-3,5 мкм в диаметре.

<i>Penicillium citreonigrum</i> (цитрусово-черный) <i>[P. citreoviride (цитрусово-зеленый)]</i>		
Рост на питательных средах	<i>Чанек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии ограниченно растущие, достигающие за 7 дней диаметра 2-2,8 см, радиально складчатые, бархатистые, с белым до ярко-желтого мицелием. Спороношение слабое до среднеобильного, в зеленовато-серых тонах. Экссудат, как правило, отсутствует, реже выделяются бесцветные или розоватые капельки. Выделяется ярко-желтый растворимый пигмент. Реверс колоний ярко-желтый, иногда желто-коричневый.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии плоские до слабо складчатых, с белым, затем желто-бежевым мицелием, среднеобильно спороносящие, спороношение иногда с голубоватым оттенком. Иногда выделяется коричневый пигмент в среду. При +37°C рост отсутствует, при +5°C иногда образуются микроколонии.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	1-ярусные, гладкостенные, длиной 60-100 мкм, без вздутия на верхушке.
	<i>фиакиды</i>	Фляговидные, длиной 5-12 мкм.
	<i>конидии</i>	Шаровидные, мелкие, 1,8-2,8 мкм в диаметре.

<i>Penicillium citrinum</i> (лимонно-желтый)		
Рост на питательных средах	<i>Агар Чанека</i>	Колонии ограниченно растущие, достигающие за 7 дней диаметра 1-1,5 см, бархатистые до почти кожистых, с сине-зеленым спороношением. Реверс желтый или оранжевый.
	<i>Чанек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии спороносят среднеобильно, иногда с бесцветным или желтоватым экссудатом, с желто-коричневым (иногда красно-коричневым до оливкового) реверсом, выделяют желтый растворимый пигмент. При +37°C растет медленно, достигая 2-12 мм в диаметре за 7 дней, обычно не спороносит.
	<i>Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)</i>	Колонии серо-зеленые с отчетливым синеватым оттенком, иногда с мелкими желтоватыми каплями экссудата.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	Преимущественно 2-ярусные, гладкостенные, длиной 50-300 мкм и толщиной 2-3 мкм.
	<i>метулы</i>	В мутовках по 3-5, расходящиеся, длиной 12-20 мкм.
	<i>фиакиды</i>	Фляговидные, 7-12 × 2-2,5 мкм.
	<i>конидии</i>	Шаровидные или почти шаровидные, гладкостенные, 2,5-3 мкм в диаметре, собраны в оформленные колонки.

<i>Penicillium commune</i> (общий) [<i>P. ochraceum</i> (охряный)]		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченно растущие, достигающие за 7 дней диаметра 2,5-3 см, бархатистые до едва шерстистых, с серо-зеленым или серовато-голубоватым спороношением, с прозрачным или бежевым экссудатом (иногда он отсутствует). Реверс грязно-желтый или коричневато-желтый.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии более быстрорастущие, с серо-зеленым спороношением. Реверс ярко-желтый до бледно-желтого. Запах резкий, плесневый. При +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Преимущественно 3-ярусные, шероховатые, длиной 200-400 мкм и толщиной 3-4 мкм, с прижатыми элементами.
	метулы	Цилиндрические, длиной 10-15 мкм.
	фиалиды	Цилиндрические, с короткой, но заметной шейкой, 9-12 × 2,5-3 мкм.
	конидии	Шаровидные, гладкостенные, 3,5-4,5 мкм в диаметре.

<i>Penicillium cyclopium</i> (циклопический)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии быстрорастущие, зернистые, обильно спороносящие, светло-голубые или зеленоватые, а затем голубовато-серо-зеленые, зелено-серые. Реверс бледный или желтоватый, а затем оранжево-коричневый до пурпурового.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии достигают диаметра 2-3,5 см за 7 дней, бархатистые до пучковатых, спороношение в голубовато-зеленых или зеленых тонах, экссудат обильный, бесцветный до желтоватого. Реверс желтый, оранжевый, красно-коричневый. При +30°C за неделю развиваются небольшие колонии 2-6 мм в диаметре. При +37°C рост отсутствует.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии в диаметре 2-3,5 см на 7-е сутки, с голубовато-зеленым спороношением.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Спороношение слабо выраженное, колонии ярко-желтые, запах резкий, плесневый.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные, с прижатыми элементами.
	метулы	Цилиндрические, длиной 9,5-14 мкм.
	фиалиды	Цилиндрические, суженные в оформленную шейку, 8-9 × 2,6-2,8 мкм.
	конидии	Шаровидные или почти шаровидные, в диаметре 2,6-3,2 мкм, гладкостенные.

<i>Penicillium crustosum</i> (корочковый)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии быстрорастущие, за 7 дней достигают диаметра в 3-4 см, зернистые до пучковатых, образующие корочковидно растрескивающийся слой конидий, в массе серо-зеленый до грязно-зеленого. Реверс кремовый, бежевый или желто-коричневый; часто имеется коричневатый экссудат.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии несколько радиально бороздчатые, порошистые, корочковидные, обильно спороносящие, иногда с коремиями по краям. Иногда выделяется коричневатый растворимый пигмент.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии плоские, бархатистые, порошистые, с корковидно растрескивающейся массой конидий. Реверс бледный до желто-коричневого. При +5°C образуются колонии 2-6 мм в диаметре, при +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные до 4-ярусных, шероховатые, длиной 200-400 мкм и толщиной 3,5-4,5 мкм, с прижатыми элементами.
	метулы	Цилиндрические, длиной 10-15 мкм.
	фиакиды	Цилиндрические, с короткой, но заметной шейкой, 9-12 × 2,5-3 мкм.

<i>Penicillium expansum</i> (распростертый)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии быстрорастущие, бархатистые или хлопьевидные, реже – пучковатые, с белым мицелием. Спороношение среднеобильное, сине-зеленое до желто-зеленого. Экссудат обычно отсутствует, реже – присутствует, бесцветный или коричневатый. Водорастворимый пигмент, выделяемый в среду, и реверс колоний кремовый, оранжево-коричневый до темно-коричневого, либо же водорастворимый пигмент отсутствует, реверс беловатый. Запах имеется, сильный, несколько фруктовый.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии плоские, бархатистые до коремиеобразующих, часто без воздушного мицелия, нередко с более выраженным сероватым оттенком спороношения, чем на среде Чапека.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные, иногда – 2- и 4-ярусные, гладкостенные, в нижней части иногда шероховатые, длиной 200-500 мкм и толщиной 3-4 мкм.
	метулы	Цилиндрические, прижатые, 11-15 × 3-4 мкм.
	фиакиды	В сжатых пучках по 5-8, цилиндрические, на конце с отчетливо выраженной шейкой, 8-11 × 2,5-3,2 мкм.
	конидии	Эллиптические до почти шаровидных, гладкостенные, 3-3,5 × 2,5-3 мкм, в длинных неправильных цепях.

<i>Penicillium glandicola</i> [<i>P. granulatum</i> (зернистый)]		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченно растущие, пучковатые, со слабо выраженным спороношением в голубовато-зеленых или сизо-зеленых тонах. Реверс грязно-желтый до оранжево-коричневого. Обычно имеется резкий ароматный запах.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии на 7-е сутки 1,5-3 см в диаметре, с небольшими коремиями, с желтым, оранжево- или красно-коричневым реверсом, обычно с каплями бесцветного или желтого экссудата.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии 1-1,5 см в диаметре на 7-е сутки, с оранжевым до оранжево-красного реверсом.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии на 7-е сутки 25 см в диаметре, с ярко-оранжево-красной обратной стороной. При +30°C и +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные, с крупнобугорчатými стенками, длиной 100-200 мкм и толщиной 3,5-4,5 мкм, с прижатыми элементами.
	метулы	Цилиндрические, иногда несколько вздутые на верхушке, длиной 8-14 мкм и толщиной 3,5-4,5 мкм.
	фиалиды	Цилиндрические, суженные в отчетливую шейку, 8-11 × 2,2-3 мкм.
	конидии	Эллипсоидальные, затем почти шаровидные, гладкостенные, 3-3,5 × 2,2-2,8 мкм.

<i>Penicillium griseofulvum</i>		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченнорастущие, достигающие диаметра 1,8-2 см за 7 дней, пучковатые, со среднеобильным до обильного спороношением в грязно-зеленых или серо-зеленых тонах. Обычно присутствуют капли бесцветного или желтого экссудата. Реверс оранжево-коричневый до красно-коричневого, иногда выделяется красновато-коричневый растворимый пигмент.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии на 7-е сутки 2-3 см в диаметре, зернистые, с кремовым, бежевым или коричневым реверсом, иногда с красновато-коричневым растворимым пигментом.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии интенсивно спороносящие, с бледным до коричневого реверсом.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии 3-4,5 см в диаметре на 7-е сутки. При +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные с примесью 4- и 5-ярусных, часто дуговидные или волнистые, гладкостенные, с расходящимися веточками.
	метулы	Длиной 7,5-10 мкм и толщиной 3,5-4 мкм.
	фиалиды	Фляговидные, исключительно короткие, 4,5-6,5 × 2,2-2,5 мкм.
	конидии	Широкоэллипсоидальные, гладкостенные, 2,5-3,5 × 2,2-2,5 мкм.

<i>Penicillium hirsutum</i> [<i>P. corymbiferum</i> (цумконосный)]		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии быстро растущие, за 7 дней достигающие диаметра 2-3 см, в краевой части нередко концентрически-зонистые, обильно спороносящие, у свежих изолятов с хорошо выраженными коремиями, при повторном культивировании – скорее бархатистые. Вегетативный мицелий желтый (но по краям колоний – белый), окраска спороношения зеленая; у свежих изолятов образуются капли коричневатого экссудата. Реверс желто-коричневый до красновато-коричневого. Запах очень резкий, неприятный (изобутанол, изопентанол).
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии на 7-е сутки 2-4,5 см в диаметре, пучковатые до зернистых, с желтым до оранжево-коричневого реверсом, иногда с желто-коричневым до коричневого растворимым пигментом.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии обычно зернистые до коремиеобразующих, со средне-обильным спороношением.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии на 7-е сутки 4-5,5 см в диаметре, с желтым или кремово-желтым реверсом. При +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные с примесью 4-ярусных, шероховатые, с расходящимися веточками, длиной 100-500 мкм и толщиной 3,2-4 мкм, с прижатыми элементами.
	метулы	Цилиндрические, длиной 7,5-13 мкм и толщиной 3,2-4 мкм, часто шероховатые.
	фиалиды	Цилиндрические, с отчетливо выраженной узкой шейкой, 8-12 × 2,4-3,2 мкм.
	конидии	Шаровидные или почти шаровидные, гладкостенные, 2,2-3,8 мкм в диаметре.

<i>Penicillium oxalicum</i> (оксалатный)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии быстро растущие, бархатистые до корковых, за 10 дней достигающие диаметра 3,5-6 см, темно-серовато-зеленые от обильного спороношения, иногда с каплями экссудата. Реверс кремово-желтый, ярко-желтый до розоватого.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии бархатистые, с обильным зеленым спороношением, с желтым или иногда зеленоватым реверсом. При +5°C рост отсутствует, при +37°C хорошо и быстро растут и обильно спороносят, температурный оптимум развития — около +30°C.
Морфологические свойства	конидиеносцы	2-ярусные (иногда с дополнительной ветвью), гладкостенные, длиной 200-400 мкм.
	метулы	В мутовках по 2-4, прижатые, длиной 15-30 мкм.
	фиалиды	Игловидные, длиной 10-20 мкм.
	конидии	Эллиптические, крупные, длиной 3,5-7 мкм, иногда едва шероховатые.

<i>Penicillium ochrosalmoneum</i> (охряно-лососевый)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии слабо растущие, пушистые, различных оттенков желтого цвета от бледно-желтых до зеленовато- и светло-медово-желтых. Реверс желтый, затем оранжево-коричневатый. Конидиальное спороношение развито по всей поверхности колоний, серо-зеленое. Также образуются клейстотеции, погруженные в мицелий.
	Чапек-дрожжевой агар (СYA)	Колонии плоские или складчатые, с белым до желтого мицелием, с многочисленными клейстотециями и конидиеносцами, иногда выделяют в среду ярко-желтый растворимый пигмент и образуют светло-желтый экссудат. При +5°C рост отсутствует, при +37°C развиваются колонии 1-3 см в диаметре, сходные с развивающимися при более низких температурах, но у некоторых изолятов с более многочисленными клейстотециями.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Мицелий по краям белый, в остальной части колоний – желтый, с ярко-желтым до оранжевого реверсом, обычно с желтым водорастворимым пигментом.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Преимущественно 2-ярусные, часто неправильные, с примесью 1-ярусных, гладкостенные, длиной 40-200 мкм.
	метулы	В мутовках по 3-5, расходящиеся, длиной 12-20 мкм.
	фиалиды	Фляговидно-игловидные, длиной 6-10 мкм.
	конидии	Почти шаровидные или яйцевидные, гладкостенные, длиной 2,5-3,5 мкм, в неправильных переплетенных цепочках.
	клейстотеции	Желтоватые, ярко-желтые или оранжевые, 250-500 мкм в диаметре, твердые, созревающие за 4-6 недель или стерильные, склероциевидные.
	аски	7-9 мкм в диаметре, 8-споровые.
	аскоспоры	Эллипсоидальные, длиной 3,5-5 мкм, гладкостенные до шероховатых или шиповатых, с 2 продольными гребнями.

<i>Penicillium palitans</i> (блуждающий)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченно растущие, бархатистые до зернистых, с зеленым или темно-зеленым спороношением, с бесцветными или бежевыми капельками экссудата. Реверс кремово-желтый до коричнево-желтого, в центральной части часто коричневый. При +37°C рост отсутствует. При +5°C за 7 дней образуются небольшие колонии до 4 мм в диаметре.
	Чапек-дрожжевой агар (СYA)	Колонии бархатистые, на 7-е сутки 1,5-3 см в диаметре, с обильным темно-зеленым или зеленым спороношением, с каплями прозрачного или желтого экссудата. Реверс кремовый, с коричневым центром.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии на 7-е сутки 1,5-2,5 см в диаметре, с желтым реверсом, с зеленым спороношением.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии хорошо спороносят, на 7-е сутки 3-4,5 см в диаметре, с желтым реверсом.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные, с прижатыми элементами, шероховатые. Веточки длиной 15-25 мкм и толщиной 3-4 мкм.
	метулы	Цилиндрические, длиной 10-15 мкм.
	фиалиды	Цилиндрические, суженные в отчетливо выраженную шейку, 9-12 × 2,5-3 мкм.
	конидии	Шаровидные до почти шаровидных, гладкостенные, 3,5-4,5 мкм в диаметре.

<i>Penicillium purpureescens</i> (пурпурный)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии достигают 3,0-3,5 см в диаметре за 12-14 дней при комнатной температуре. У одних штаммов колонии четко зонированы, у других – почти зональны, радиально-морщинистые. Они состоят из довольно толстого, плотно сплетенного мицелия. Область образования конидий состоит из толстых гиф. У одних штаммов споры колонии сильно покрывают всю поверхность, у других – только на краевых участках. Область споруляции имеет цвет от темно-сине-зеленого до темно-зеленого. Конидиеносцы обычно растут компактными группами прямо из субстрата.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии достигают приблизительно 4-5 см в диаметре за 12-14 дней. Они более темные – от почти оливково-зеленого до темно-зеленого. Реверс бледный, но в тех же общих тонах, что и поверхность колоний. Метулы со споровыми колонками до 400-500 мкм в длину, отделяются при постукивании культуральной чашки.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Обычно они имеют длину от 100 до 150 мкм и диаметр от 3,0 до 3,5 мкм, относительно тонкостенные, гладкие или мелко шероховатые, слегка увеличиваясь до 4,5 мкм на вершине.
	метулы	Метулы обычно тесно моновертицилованы, иногда разветвленные, содержащие цепочки конидий в рыхлом столбике длиной от 150 до 200 мкм.
	фиалиды	Фиалиды в основном расположены группами от 8 до 12, скученными вертикально, часто появляются низко по бокам фолликулярной области. Они имеют длину от 7 до 10 мкм и ширину от 2,5 до 3,5 мкм.
	конидии	Конидии вначале эллиптические, затем шаровидные или почти шаровидные.

<i>Penicillium verrucosum</i> (бородавчатый)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченно растущие, за 7 дней не достигают диаметра в 1 см, бархатистые до едва зернистых; спороношение зеленое, выделяются капли бесцветного экссудата. Реверс кремово-желтый, в центре часто коричневый.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии от низких бархатистых до выпуклых пучковатых или шерстистых, с реверсом от желто-коричневого до темно-коричневого цвета; мицелий белый.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии медленно растущие, зернистые до пучковатых, с зеленым спороношением. При температуре +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные (иногда с примесью 2-ярусных или 4-ярусных у разных изолятов), в той или иной степени шероховатые, длиной 200-450 мкм и толщиной 3-4 мкм, с прижатыми элементами. Веточки иногда шероховатые.
	метулы	Цилиндрические, длиной 8-13 мкм.
	фиалиды	Цилиндрические, с короткой, но заметной шейкой, 7-9 × 2,2-2,8 мкм.
	конидии	Шаровидные до почти шаровидных, отчетливо шероховатые, в диаметре 2,6-4,2 мкм, в неправильных цепочках.

<i>Penicillium viridicatum</i> (зеленоватый)		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченно растущие, зернистые до пучковатых, желто-зеленые или ярко-зеленые от обильного спороношения, часто с каплями экссудата. Реверс оранжевый, красный, розовато-коричневый, реже – кремово-желтый.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии с желтоватым, розоватым или коричневатым экссудатом. Реверс различных оттенков оранжево-коричневого.
	Агар с солодовым экстрактом (МЕА)	Колонии бархатистые до зернистых, в центре иногда шерстистые, с желто-зеленым среднеобильным спороношением. Реверс желтый до оранжевого. При +5°C образуются колонии до 2-5 мм в диаметре, при +37°C рост отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные, шероховатые, с прижатыми элементами, длиной 200-450 мкм и толщиной 3-4 мкм.
	метулы	Цилиндрические, на верхушке несколько вздутые, длиной 9,5-13 мкм.
	фиалиды	Фляговидные с короткой, но заметной шейкой, 7-9 × 2,2-2,8 мкм.
	конидии	Шаровидные до почти шаровидных, едва шероховатые, 2,6-3,4 мкм в диаметре.

<i>Penicillium vulpinum</i> (сосновый) [<i>P. claviforme</i> (булавовидный)]		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии умеренно растущие, за 7 дней достигающие диаметра 1-2 см, с белым или сероватым мицелием, образуют оформленные коремии с кремовой или розовой ножкой высотой до 3-10 мм, часто расположенные концентрическими кругами, несущие серо-зеленые головчатые сплетения кисточек. Реверс коричневатый.
	Чапек-дрожжевой агар (СУА)	Колонии достигают 1,5-4 см, с зеленовато-серым спороношением, с прозрачными каплями экссудата, с кремовым до красно-коричневого реверсом.
Морфологические свойства	конидиеносцы	3-ярусные, плохо оформленные, с многочисленными неправильными ответвлениями на синнемах.
	метулы	Иногда со вздутием на верхушке, длиной 9-12 мкм.
	фиалиды	Цилиндрические, с короткой шейкой, 8-11 × 2,2-3 мкм.
	конидии	Эллипсоидальные, гладкостенные, 4-4,5 × 3-3,5 мкм.

<i>Talaromyces islandicus</i> (исландский) [<i>Penicillium islandicum</i>]		
Рост на питательных средах	Чапек-дрожжевой агар (CYA)	Колонии на 7-е сутки 2-3 см в диаметре, с белым, желтым и оранжевым мицелием, бархатистые или неясно пучковатые, со скудным до обильного спороношением в серо-зеленых или тускло-зеленых тонах. Экссудат обычно присутствует у слабо спороносящих изолятов в виде крупных бесцветных капель. Растворимый пигмент не выделяется. Реверс колоний коричневый в центре до светло-желтого по краям, иногда неокрашенный.
	Агар с солодовым экстрактом (MEA)	Колонии с белым и оранжевым мицелием, в центре кратеровидные, обычно бархатистые. Спороношение скудное до обильного, серо-зеленое, тускло-зеленое, темно-зеленое. Реверс коричнево-оранжевый. Растворимый пигмент в среду не выделяется.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии в центре кратеровидные, с белым, красным и оранжевым мицелием, бархатистые, с обильным тускло-зеленым, темно-зеленым или серо-зеленым спороношением. Растворимый пигмент не выделяется, реверс колоний коричнево-оранжевый.
Морфологические свойства	конидиеносцы	2-ярусные кисточки, нередко с дополнительными метулами, с гладкостенной ножкой длиной 20-200 мкм и толщиной 2,5-3,5 мкм.
	метулы	В мутовке по 3-6, расходящиеся, длиной 6-12 мкм.
	фиалиды	Игловидные, по 3-6 в пучке, 7-10 × 1,5-3 мкм.
	конидии	Эллипсоидальные, гладкостенные, 2,5-6 × 2-4,5 мкм.

<i>Talaromyces purpurogenus</i> (пурпурный) [<i>Penicillium purpurogenum</i>]		
Рост на питательных средах	Агар Чапека	Колонии ограниченно растущие, на 7-е сутки 1,5-2,5 см в диаметре, бархатистые до почти пушистых, с желтым или оранжево-красноватым малозаметным мицелием, по краю белым. Спороношение обильное, в темно-зеленых тонах. Экссудат иногда обильный, оранжево-красный. Реверс темно-красный до фиолетового, выделяемый в среду пигмент кроваво-красный до фиолетово-красного.
	Чапек-дрожжевой агар (CYA)	Колонии на 7-е сутки 2-2,5 см в диаметре, радиально-складчатые, с белым и красным мицелием, шерстистые, со скудным до обильного спороношением в тускло-зеленых тонах. В среду выделяется ярко-красный пигмент. Экссудат отсутствует. Реверс колоний темно-коричневый до фиолетово-коричневого.
	Агар с солодовым экстрактом (MEA)	Колонии с белым и светло-оранжевым мицелием, в центре несколько приподнятые, бархатистые и шерстистые. Спороношение обильное, тускло-зеленое, иногда отсутствует. Реверс коричнево-желтый или коричнево-оранжевый. Растворимый пигмент в среду не выделяется.
	Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)	Колонии с белым и светло-оранжевым мицелием, с обильным тускло-зеленым или серо-зеленым спороношением. Растворимый пигмент не выделяется, реверс колоний в центре коричневый, по краям до светло-желтого, изредка темно-красный или красно-коричневый.
Морфологические свойства	конидиеносцы	2-ярусные кисточки, с гладкостенной ножкой длиной 70-200 мкм и толщиной 1,5-3 мкм.
	метулы	В мутовке по 3-5, расходящиеся, длиной 12-15 мкм.
	фиалиды	Игловидные, по 3-6 в пучке, 12-14 × 3 мкм.
	конидии	Широкоэллипсоидальные, гладкостенные, 3-3,5 × 2-2,5 мкм.

<i>Talaromyces ruber</i> (красный) [<i>Penicillium rubrum</i>]		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии на 7-е сутки 2-3,5 см в диаметре, вдавленные в центральной части, с белым, желтым и красным мицелием, с обильным спороношением в оливково-зеленых или серо-зеленых тонах. В среду выделяется необильный красный пигмент. Экссудат отсутствует. Реверс коричнево-красный.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии с белым и желтым мицелием, в центре несколько приподнятые и вдавленные, бархатистые. Спороношение обильное, серо-зеленое. Реверс в центре до темно-коричневого, ближе к краю – коричнево-красный, иногда серо-желтый или серо-оранжевый. Растворимый пигмент в среду не выделяется.
	<i>Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)</i>	Колонии в центре приподнятые, с белым мицелием, обычно бархатистые, с обильным серо-зеленым спороношением. Растворимый пигмент не выделяется, реверс колоний серо-коричневый, коричневый, ближе к краю – оранжевый, светло-коричневый.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	2-ярусные кисточки, с гладкостенной ножкой длиной 100-250 мкм и толщиной 2,5-3 мкм.
	<i>метулы</i>	По 3-5 в мутовке длиной 7-12 мкм.
	<i>фиалиды</i>	Игловидные, по 3-6 в пучке, 9-12 × 2-2,5 мкм.
	<i>конидии</i>	Эллипсоидальные, гладкостенные, 2,5-3,5 × 1,5-2 мкм.

<i>Talaromyces verruculosus</i> (бородавчатый) [<i>Penicillium verruculosum</i>]		
Рост на питательных средах	<i>Чапек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии на 7-е сутки 3-3,5 см в диаметре, радиально-бороздчатые, с белым и желтым мицелием, шерстистые, с довольно обильным спороношением в серо-зеленых тонах. Экссудат и растворимый пигмент не выделяются. Реверс колоний в центре серо-желтый до серовато-оранжевого, ближе к краю бледный.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии с белым и желтым мицелием, шерстистые, местами пучковатые. Спороношение довольно обильное, серо-зеленых тонов. Реверс серовато-оранжевый.
	<i>Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)</i>	Колонии с белым, желтым и розовым мицелием, шерстистые, не спороносящие. Растворимый пигмент не выделяется, реверс колоний в центре серовато-оранжевый, по краям бледный.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	2-ярусные кисточки с гладкостенной ножкой 150-300 мкм длиной и 2,5-3 мкм толщиной.
	<i>метулы</i>	В конечной мутовке по 4-8, расходящиеся, 8,5-12,5 мкм длиной.
	<i>фиалиды</i>	Фляговидные, суженные у очень узкую шейку, по 3-5 в пучке, 8,5-10,5 × 2,5-3,5 мкм.
	<i>конидии</i>	Шаровидные, шиповатые, 3-3,5 мкм в диаметре.

<i>Talaromyces wortmannii</i> (Вортмана) [<i>Penicillium wortmannii</i>]		
Рост на питательных средах	<i>Агар Чапека</i>	Колонии ограниченно растущие, пушисто-волокнистые, с белым или желтым, иногда оранжеватым мицелием. Спороношение в голубовато-зеленых тонах. Реверс желтый до оранжево-коричневого. У некоторых штаммов образуются клейстотеции.
	<i>Чапек-дрожжевой агар (СУА)</i>	Колонии на 7-е сутки 2-3 см в диаметре, несколько радиально-складчатые, с белым мицелием, бархатистые, с практически не выраженным до обильного спороношением в серо-зеленых или тускло-зеленых тонах. Экссудат и растворимый пигмент не выделяются. Реверс колоний в центре коричневый, по краям до красновато-желтого или серовато-оранжевого, либо в центре желто-коричневый, по краям до оливкового или серовато-желтого, либо желтый с более темными точками. У некоторых штаммов при культивировании 9 дней и дольше образуются клейстотеции.
	<i>Агар с солодовым экстрактом (МЕА)</i>	Колонии с белым, изредка желтым мицелием, бархатистые. Спороношение от практически отсутствующего до обильного, тускло-зеленое до серо-зеленого. Реверс коричневый до коричнево-оранжевого, иногда бледный.
	<i>Агар с дрожжевым экстрактом и сахарозой (YES)</i>	Колонии с белым, реже – желтым мицелием, с невыраженным до обильного тускло-зеленым или серо-зеленым спороношением. Растворимый пигмент не выделяется, реверс колоний в центре светло-желтый до серовато-оранжевого, по краям до серовато-желтого или оливкового, либо оранжевый или золотисто-желтый в центре до желтого ближе к краям.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	2-ярусные кисточки, иногда с дополнительными веточками, 100-400 мкм длиной и 2,5-4 мкм толщиной.
	<i>метулы</i>	В конечной мутовке по 3-6, расходящиеся, 7-15 мкм длиной.
	<i>фиалиды</i>	Игловидные до почти флаговидных, по 3-6 в пучке, 7-15 × 2-3,5 мкм.
	<i>конидии</i>	Эллипсоидальные, гладкостенные, 2,5-6 × 1,5-3,5 мкм.
	<i>клейстотеции</i>	Ярко-желтые до оранжевых, шаровидные, мягкие (образуются не у всех штаммов, только на более бедных средах – агаре Чапека и овсяном агаре).
	<i>аски</i>	Почти шаровидные, 8-14 × 7-11 мкм.
	<i>аскоспоры</i>	Широкоэллипсоидальные, шиповатые до гладкостенных, 3,5-6 × 2,5-4 мкм.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВИДОВ ГРИБОВ *FUSARIUM*

<i>Fusarium avenaceum</i> (овсяный)		
Рост на питательных средах	<i>Картофельно-декстрозный агар (PDA)</i>	Колонии с обильным пушистым воздушным мицелием в белых, желтоватых, серовато-розовых тонах, быстрорастущие до медленнорастущих. В центральной части образуются обильные оранжеватые до коричневатых спородохии. В среду выделяется серовато-розовый до малинового пигмент.
	<i>Агар с гвоздичными листьями (CLA)</i>	Образуются макроконидии шиловидные до нитевидных, обычно эллиптически-изогнутые, с 3-7 септами (преимущественно с 5 септами). Верхняя клетка нитевидно удлиненная, нижняя клетка с ножкой в основании.
Морфологические свойства	<i>макроконидии</i>	С 5 септами 32-90 × 3-6 мкм.
	<i>микроконидии</i>	Обычно отсутствуют, реже – веретеновидные, 2-3-клеточные, образуются на фиалидах и полифиалидах.
	<i>хламидоспоры</i>	Отсутствуют.

<i>Fusarium chlamydosporum</i>		
Рост на питательных средах	<i>Картофельно-декстрозный агар (PDA)</i>	Быстро растущие колонии. Воздушный мицелий обильный, клочковато-бархатистый, войлочный, бело-розовых, иногда коричневых оттенков. Пигментация реверса винно-красная, коричнево-красная, иногда охряно-коричневая. Склероции формируются редко, в старых культурах. Споруляция начинается через несколько суток, образуются многочисленные микроконидии, придающие мицелию порошистый вид. Запах отсутствует.
Морфологические свойства	<i>конидиеносцы</i>	В начале неразветвленные, позже – густоветвящиеся, несущие полибластические конидиогенные клетки, обычно с большим количеством конидиогенных локусов. На каждом конидиогенном локусе образуются микроконидии одиночно или парами. Конидиеносцы с конидиями <i>in situ</i> похожи на пальмы.
	<i>макроконидии</i>	Редкие, образуются в спородохиях, иногда в воздушном мицелии. Серповидные, в верхней части более широкие, в основном с 3 (реже с 4-5) перегородками. Апикальная клетка короткая, крючковатая, базальная – не выражена.
	<i>микроконидии</i>	Обычно 1-клеточные, иногда с 1-2 перегородками, веретеновидные, яйцевидные (шаровидные и шаровидные с остроконечием не формируются).
	<i>хламидоспоры</i>	Обильные, округлые с грубой оболочкой, одиночные, в парах, цепочках и кластерах.

<i>Fusarium culmorum</i> (соломинковый)		
Рост на питательных средах	Картофельно-декстрозный агар (PDA)	Колонии с обильным пушистым воздушным мицелием в белых, оливково-желтоватых, охристо-красноватых тонах, быстрорастущие. В центральной части образуются обильные оранжеватые спородохии. В среду выделяется красный, реже – оливково-коричневый пигмент.
	Агар с гвоздичными листьями (CLA)	Образуются макроконидии веретеновидно-серповидные до серповидных, обычно эллиптически-изогнутые, с 3-4 (5) септами. Верхняя клетка короткая, закругленная, иногда с сосочком, нижняя клетка с ножкой или сосочком в основании.
Морфологические свойства	макроконидии	С 3 септами 15-56 × 3,7-11,5 мкм.
	микрoконидии	Отсутствуют.
	хламидоспоры	Обычно образуются через 3-5 недель.

<i>Fusarium graminearum</i> (злаковый)		
Рост на питательных средах	Картофельно-декстрозный агар (PDA)	Колонии с обильным пушистым воздушным мицелием в белых, бледно-оранжевых, желтых тонах, быстрорастущие. После месяца культивирования образуются красно-коричневые до оранжевых спородохии. В среду выделяется красный пигмент.
	Агар с гвоздичными листьями (CLA)	Макроконидии образуются в спородохиях, в пионнотах, в воздушном мицелии, веретеновидно-серповидные, эллиптически-изогнутые, с 5-6 септами. Верхняя клетка постепенно суженная, коническая, нижняя клетка с отчетливой ножкой в основании.
Морфологические свойства	макроконидии	С 5 септами 35-75 × 3,2-6 мкм.
	микрoконидии	Отсутствуют.
	хламидоспоры	Могут образовываться при длительном культивировании.
	перитеции	Черно-синие.
	аски	8-споровые, булавовидные.
	аскоспоры	Веретеновидные, слабо изогнутые, пятиклеточные (иногда 2-клеточные), 16-33 × 3-6 мкм.

<i>Fusarium poae</i>		
Рост на питательных средах	Картофельно-декстрозный агар (PDA)	Колонии с обильным пушистым воздушным мицелием в беловатых тонах, с возрастом приобретают красно-коричневую окраску. Реверс колоний и выделяемый в агар пигмент часто красных тонов, реже – желтые, розовые, иногда отсутствуют. Иногда образуются спородохии. Для большинства культур этого вида характерен сладкий, фруктовый запах.
	Агар с звездичными листьями (CLA)	Макроконидии образуются редко, преимущественно из моноспоровых культур, веретеновидно-серповидные, с 3-5 септами (преимущественно с 3 септами). Верхняя клетка изогнутая, постепенно суженная, нижняя клетка с ножкой в основании.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Неразветвленные и разветвленные, с монофиалидными конидиогенными клетками.
	макроконидии	Редкие, образуются в воздушном мицелии, веретеновидно-серповидные, с 2-3 септами, 17-40 × 3-5 мкм.
	микроконидии	В большом количестве грушевидные или лимоновидные без перегородок, или булавовидные с 1 перегородкой, возникают на простых или разветвленных гифах мицелия (конидиеносцах), покрывают мицелий в виде белого порошка. Большею частью 1-клеточные, реже – 2-клеточные, 3,8-9,5 × 3,8-6,1 мкм.
	хламидоспоры	Как правило, не образуются. В старых культурах иногда наблюдается утолщение стенок гиф мицелия, которые могут быть похожими на хламидоспоры.

<i>Fusarium sporotrichioides</i>		
Рост на питательных средах	Картофельно-декстрозный агар (PDA)	Колонии быстро растущие, воздушный мицелий обычно обильный, пушистый, иногда порошистый, белый, бело-розовый, розоватый, желтовато-красноватый. Пигментация реверса бледно-розовая в начале, затем карминовая, винно-красная, иногда появляются охряно-коричневые оттенки. Склероции формируются регулярно. Споруляция начинается быстро, образуются многочисленные микроконидии, собранные в ложные головки. Запах отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	Неразветвленные и разветвленные, несущие монофиалидные, полифиалидные и полибластические конидиогенные клетки.
	макроконидии	Образуются в воздушном мицелии, веретеновидно-серповидные, с постепенно суживающейся апикальной клеткой, с более или менее выраженной ножкой (базальной клеткой), обычно с 3 перегородками (реже – с 5-7 перегородками).
	микроконидии	Чаще всего 1-клеточные, иногда бывают с 1-3 перегородками. Форма чаще всего эллипсоидная, реже – шаровидная, грушевидная или веретеновидная.
	хламидоспоры	Обильные, в гифах, обычно в цепочках, охряно-коричневые.

<i>Fusarium tricinctum</i>		
Рост на питательных средах	Картофельно-декстрозный агар (PDA)	Колонии быстро растущие, воздушный мицелий обильный, плотнобархатистый, карминовый, реже – бело-красный, иногда охряных оттенков. Пигментация реверса интенсивно карминовая до винно-красной, с возрастом может быть коричнево-красной или охряно-коричневой. Склероции формируются регулярно. Запах отсутствует.
Морфологические свойства	конидиеносцы	С вытянутыми клетками, в начале неразветвленные, позже – элегантно ветвящиеся, несущие монофиалидные конидиогенные клетки.
	макроконидии	Обычно формируются в спородохиях, редко – в воздушном мицелии, тонкие, серповидные, с 3-5 перегородками. Апикальная и базальные клетки равномерно суженные, удлиненные.
	микроконидии	Лимоновидной, грушевидной и в меньшем количестве продолговато-изогнутой формы, 1-клеточные или с 1 перегородкой, собраны в ложные головки. Образование микроконидий начинается с возрастом культуры.
	хламидоспоры	Образуются редко, в основном в гифах мицелия, в цепочках или кластерах. Спородохии формируются через несколько недель.

<i>Fusarium verticillioides</i>		
Рост на питательных средах	Картофельно-декстрозный агар (PDA)	Мицелий хорошо развит, пушистый. Цвет белый, бело-розовый, розовато-карминовый или лиловатый.
Морфологические свойства	макроконидии	Образуются в воздушном мицелии, иногда в спородохиях и пиннотах. Форма шиловидная, слегка серповидная, эллиптически изогнутая либо почти прямая, но с уменьшением ширины к обоим концам. Верхняя клетка постепенно сужается, короткая, иногда клювовидно загнутая. Ножка четко выражена либо сосочковидная. В строении макроконидий насчитывают от 3 до 5, реже – 6-7 перегородок.
	микроконидии	Веретеновидно-яйцевидные, 1-клеточные или с 1 перегородкой. Располагаются в цепочках или ложных головках, разбросанных в воздушном мицелии в виде порошка.
	хламидоспоры	Отсутствуют.
	склероции	Темно-синие, шаровидные, диаметром 80-100 мкм.

**КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВИДОВ ГРИБОВ
*DENDRODOCHIUM, STACHYBOTRYS, PITHOMYCES, ALBIFIMBRIA,
CLAVICEPS, SPHACELIA***

Dendrodochium toxicum

При первичном посеве в чашках на внутренней поверхности стебля растения на 2-3-й день появляется мицелий, а на 4-5-е сутки на нем возникают подушечки спородохии, округлой или неправильной формы с белым мицелиальным ободком по периферии с оливково-черным или черным слоем конидий в центре.

При исследовании препарата обнаруживают скученным плотным слоем на сплетении гиф конидиеносцы в спородохиях, неправильно или древовидно разветвленные, с конечными обычно мутовчатыми ответвлениями. Конидии эллиптические, по обоим концам заостренные, бесцветные, бледно-зеленоватые, в массе оливковые или оливково-зеленые, длиной 6,2-8,4 мкм (реже – 9,2 мкм) и шириной 2-4,2 мкм.

Stachybotrys alternans (S. chartarum, S. atra)

При первичном посеве соломы на среды в чашках Петри через 3-5 дней на соломинках появляется черный налет, состоящий из спор гриба, обнаруживаемых микроскопическим исследованием.

Для выделения чистой культуры из чашки Петри производят пересев в пробирки на агар Чапека. На этом агаре молодой мицелий белый, с возрастом и развитием спороношения колония становится черно-сажистой. Старые культуры имеют буро-черную окраску. Край колонии в пробирке при малом увеличении микроскопа имеют черные образования в виде головок, сидящие на ответвлениях мицелия – конидиеносцах.

Конидиеносцы часто симподиально разветвлены, бледно-оливковые с перегородками длиной 42,5-52 мкм и шириной 3-5 мкм. На вершине конидиеносца имеется от 5 до 8 выростов стеригм, несущих конидии, чаще собранные пучком и сросшиеся у основания.

Конидии эллиптические, округлые, бледно-оливковые с гладкой оболочкой, с возрастом темнеющие, мелкошиповато-бородавчатые или гладкие, постепенно приобретающие почти черный цвет, длиной 6,3-12,6 мкм и шириной 3,2-6,3 мкм.

Pithomyces chartarum

Образует (редко) многоклеточные и темно-пигментированные споры, которые могут быть бочкообразными, эллипсоидными или булабовидными.

Гриб имеет 3 вегетативных типа гиф: с редкими перегородками, с плотными перегородками и с густыми перегородками с поверхностными шипами. Колонии растут быстро, их морфология зависит от температуры. При температуре ниже +20°C преобладают колонии с разреженными перегородками, а при температуре +26°C – с плотными перегородками.

Прорастающие споры образуют гиалиновые поверхностные гифы, которые могут легко проникать через стенки растительных клеток. Конидиеносцы несут простые конидии, короткие, тонкостенные и обычно не разделенные. Конидии считаются алевриоконидиями, т.к. они возникают по отдельности на вершине каждой конидиофоры. Конидии также могут образовывать скопления в сети конидиогенных ветвей. Зрелые конидии обычно имеют 3 поперечных перегородки и до 2 продольных перегородок.

Albifimbria verrucaria (Myrothecium verrucaria)

Колонии на картофельно-декстрозном агаре (PDA) на 14-е сутки достигают 4-5 см в диаметре, без выраженного воздушного мицелия, либо с довольно обильным пушистым беловатым до розовато-кремового воздушным мицелием. Реверс колоний розовато-кремовый. Конидиальное спороношение рассеянное, либо формируются бледно-оливковые до черных спородохии, иногда приподнятые на стерильной ножке.

Гифы гладкостенные, 1,5-3 мкм толщиной. Иногда образуется тонкая строма из неокрашенных клеток 3,5-5 мкм в диаметре.

Конидиеносцы многократно разветвленные. Фиалиды на концах веточек в мутовках по 3-6, образующиеся на разных веточках фиалиды плотно прижатые в больших группах, параллельные, цилиндрические, иногда несколько заостренные на верхушке, 10,5-14,5 × 1,5-2 мкм. Конидии широковеретеновидные, с веерообразным придатком.

Claviceps purpurea

Телеоморфа

Склероции продолговатые, на концах закругленные, снаружи черно-фиолетовые, внутри почти белые, до 5 см длиной.

Строма головчатая, на стерильной ножке, развивается одиночно или группами на опавшем склероции. Ножка цилиндрическая, красновато-бурая, гладкая, высотой до 15-20 мм, толщиной до 0,5 мм.

Головка шаровидная, пурпуровая, до 2 мм в диаметре, шероховатая от выступающих точковидных устьиц перитециев.

Перитеции расположены в 1 ряд в периферической части строматической головки, продолговато-яйцевидные, широкобутыльчатые, 140-300 × 80-110 мкм, с тонкой бесцветной оболочкой, толщиной 6-7 мкм. Устьичные каналы выстланы перифизами.

Сумки (аски) 8-споровые, удлинено-цилиндрические, 70-80 × 3-5 мкм, с утолщенной верхушкой, с порой.

Споры нитчатые, бесцветные, расположены в сумке параллельно, достигают ее длины, до 1 мкм шириной, становятся септированными после освобождения из сумки.

Анаморфа (Sphacelia segetum)

Культивирование в термостате при постоянной температуре +24±1°C в течение 30 суток приводит к формированию распростертых колоний с возвышающимся центром. Диаметр колоний 1,7-2,3 мм, цвет белый, края фасеточные, поверхность войлочная. По мере развития центр приобретает бархатистость и бежевый оттенок. В самом начале выращивания отмечается незначительное формирование длинного, разветвленного мицелия. Конидии образуются на 10-12-е сутки.

Конидиеносцы 1-клеточные, цилиндрические, тесно скрученные, 9-12 × 2-3 мкм.

Конидии эллиптические, 1-клеточные, 4-6 × 2-3 мкм.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

ТОКСИЧЕСКИЕ МЕТАБОЛИТЫ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ ТОКСИКОГЕННЫМИ ГРИБАМИ

Токсикогенные грибы	Продуцируемые токсические метаболиты
<i>Aspergillus candidus</i>	койевая кислота
<i>Aspergillus clavatus</i>	патулин
<i>Aspergillus flavus</i>	афлатоксины В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂
<i>Aspergillus fumigatus</i>	фумигоклавин, глиотоксин
<i>Aspergillus nidulans</i>	стеригматоцистин, эместрин
<i>Aspergillus niger</i>	аспергиллин, ниграгиллин, койевая кислота
<i>Aspergillus ochraceus</i>	охратоксин А
<i>Aspergillus parasiticus</i>	афлатоксины В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂
<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	стеригматоцистин
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	ксантомегнин, виомеллеин
<i>Aspergillus sulphureus</i>	охратоксин А
<i>Aspergillus terreus</i>	территремы, патулин, цитреовиридин, цитринин, геодин, эмодин, терретонин, глиотоксин, цитохалазин
<i>Aspergillus ustus</i>	стеригматоцистин
<i>Aspergillus versicolor</i>	стеригматоцистин
<i>Penicillium camemberti</i>	циклопиазоновая кислота
<i>Penicillium chrysogenum</i>	рокфортины С и D, мелеагрин, хризогин
<i>Penicillium citreonigrum</i>	цитреовиридин
<i>Penicillium citrinum</i>	цитринин
<i>Penicillium commune</i> (<i>P. ochraceum</i>)	циклопиазоновая кислота
<i>Penicillium crustosum</i>	пенитремы, рокфортин С, террестровая кислота
<i>Penicillium cyclopium</i>	ксантомегнин, виомеллеин, виоксантин
<i>Penicillium expansum</i>	патулин, цитринин, рокфортин С, коммунезины, хетоглобозин С
<i>Penicillium glandicola</i> (<i>P. granulatum</i>)	патулин, пенитрем А, рокфортин С
<i>Penicillium griseofulvum</i>	патулин, циклопиазоновая кислота, рокфортин С, шикимовая кислота
<i>Penicillium hirsutum</i> (<i>P. corymbiferum</i>)	рокфортин С, террестровая кислота
<i>Penicillium ochrosalmoneum</i>	цитреовиридин
<i>Penicillium oxalicum</i>	секалоновые кислоты D и F, рокфортин С
<i>Penicillium palitans</i>	циклопиазоновая кислота, фумигаклавин
<i>Penicillium purpurescens</i>	хадацидин

Токсикогенные грибы	Продуцируемые токсические метаболиты
<i>Penicillium verrucosum</i>	охратоксин А, цитринин
<i>Penicillium viridicatum</i>	ксантомегнин, виомеллеин, виоксантин, виридовая кислота, пеницилловая кислота, ксантовиридикатины
<i>Penicillium vulpinum</i> (<i>P. claviforme</i>)	патулин, рокфортин С
<i>Talaromyces islandicus</i> (<i>Penicillium islandicum</i>)	лютеоскирин, симатоксин, циклохлоротин, ругулозин, исландитоксин, хитозаназа
<i>Talaromyces purpurogenus</i> (<i>Penicillium purpurogenum</i>)	рубратоксины А и В, пурпурогенон
<i>Talaromyces ruber</i> (<i>Penicillium rubrum</i>)	койевая кислота, миторубрин, миторубринол, рубратоксины А и В, рубралактон, рубрамин
<i>Talaromyces verruculosus</i> (<i>Penicillium verruculosum</i>)	веррукулоген, веррукозидин, веррукулотоксин, пенитрем
<i>Talaromyces wortmannii</i> (<i>Penicillium wortmannii</i>)	ругулозин А
<i>Fusarium avenaceum</i>	боверицин, фузарин С, монилиформин
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	хламидоспорол, акуминатопирон, монилиформин, энниатины, фузарин С
<i>Fusarium culmorum</i>	монилиформин, фузарин С
<i>Fusarium graminearum</i>	зеараленон, ниваленон
<i>Fusarium poae</i>	ниваленон, диацетоксисцирпенол, моноацетилсцирпенол, сцирпенол, фузаренон-Х, Т-2, НТ-2, фузарин С, бутенолид, аурофузарин
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Т-2, НТ-2, неосоланиол, фузаренон-Х, бутенолид, фузарин С, аурофузарин
<i>Fusarium tricinctum</i>	фузарин С, монилиформин, энниатины, аурофузарин
<i>Fusarium verticillioides</i>	фузарин С, фумонизины
<i>Dendrodochium toxicum</i>	дендродохины
<i>Stachybotrys alternans</i> (<i>S. chartarum</i>)	трихотецены (веррукарин J, роридины Е и Н, сатратоксины F, G и H, триховерины и триховееролы), стахиботриолактон, стахиботриолактамы, циклоспорин
<i>Pithomyces chartarum</i>	спородесмин
<i>Myrothecium roridum</i>	миротоксин В
<i>Albifimbria verrucaria</i> (<i>Myrothecium verrucaria</i>)	веррукарин А, роридин А
<i>Claviceps paspali</i>	паспалинин
<i>Claviceps purpurea</i>	производные лизергиновой кислоты (эрготамин, эрготоксин, эргозин, эргометрин, эргокриптин, эргокристин и др.), клавиновые алкалоиды (аргоклавин, элимоклавин, сетоклавин и др.)
<i>Slafractonia leguminicola</i> (<i>Rhizoctonia leguminicola</i>)	слафрамин
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	фомопсины А и В
<i>Stenocarpella maydis</i> (<i>Diplodia maydis</i>)	диплоидиатоксин, хетоглобозины, диплонин, стахидрин

ПРИЛОЖЕНИЕ E

ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ УРОВНИ МИКОТОКСИНОВ И СОДЕРЖАНИЯ ВРЕДНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ЗЕРНЕ, ПОСТАВЛЯЕМОМ НА КОРМОВЫЕ ЦЕЛИ

Пределно допустимые уровни микотоксинов

Показатели	Допустимые уровни, мг/кг, не более	Примечание
<i>Злаковые</i> (пшеница, ячмень, овес, рожь, тритикале, просо, сорго, кукуруза)		
Афлатоксин В ¹	0,02	
Охратоксин А	0,05	
Т-2 токсин	0,1	
Дезоксиниваленол	1,0	
Зеараленон	1,0	
Фумонизин	5,0	Кукуруза
Сумма афлатоксинов В ¹ , В ² , G ¹ , G ²	0,02	
<i>Зернобобовые (горох, люпин, кормовые бобы, вика, нут, чечевица, чина)</i>		
Афлатоксин В ¹	0,02	
Охратоксин А	0,05	
Т-2 токсин	0,1	
Дезоксиниваленол	1,0	
Зеараленон	1,0	
Сумма афлатоксинов В ¹ , В ² , G ¹ , G ²	0,02	
<i>Масличные (соя, рапс, подсолнечник)</i>		
Афлатоксин В ¹	0,02	
Охратоксин А	0,05	
Т-2 токсин	0,1	
Дезоксиниваленол	1,0	
Зеараленон	1,0	

Пределно допустимые уровни содержания вредных примесей

Наименование показателя	Допустимый уровень, %, не более	Наименование зерна
Спорынья и головня (по совокупности)	0,1	Пшеница, ячмень, овес, рожь, просо, сорго, тритикале
	0,15	Кукуруза
Головневые зерна (мараные, синегузочные)	10,0	Пшеница, тритикале
Фузариозные зерна	1,0	Пшеница, ячмень, рожь, тритикале

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ УРОВНИ МИКОТОКСИНОВ И СОДЕРЖАНИЯ ВРЕДНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ЗЕРНЕ, ПОСТАВЛЯЕМОМ НА ПИЩЕВЫЕ ЦЕЛИ

Пределно допустимые уровни микотоксинов

Показатели	Допустимые уровни, мг/кг, не более	Примечание
<i>Злаковые культуры (пшеница, рожь, тритикале, овес, ячмень, просо, гречиха, рис, кукуруза, сорго)</i>		
Афлатоксин В1	0,005	
Дезоксиниваленол	0,7	Пшеница
	1,0	Ячмень
Т-2 токсин	0,1	
Зеараленон	1,0	Пшеница, ячмень, кукуруза
Охратоксин А	0,005	Пшеница, ячмень, рожь, овес, рис
Фумонизин	4,0	Кукуруза (сырая)
<i>Зернобобовые культуры (горох, фасоль, нут, чечевица, бобы, маш, чина)</i>		
Афлатоксин В1	0,005	
<i>Масличные культуры (подсолнечник, соя, хлопчатник, лен, рапс, горчица, кунжут, арахис)</i>		
Афлатоксин В1	0,005	

Пределно допустимые уровни содержания вредных примесей

Наименование зерна	Наименование показателя	Допустимый уровень, %, не более
Пшеница	Спорынья	0,05
	Головневые (мараные, синегузочные) зерна	10,0
	Фузариозные зерна	1,0
Рожь, тритикале	Спорынья	0,05
	Фузариозные зерна	1,0
	Розовоокрашенные зерна	3,0
Овес	Термопсис ланцетный, спорынья и головня (по совокупности)	0,1
Ячмень	Спорынья и головня	0,1
Просо	Плевел опьяняющий, софора лисохвостная, термопсис ланцетный, спорынья и головня (по совокупности)	0,18
Гречиха	Спорынья	0,05
Кукуруза	Спорынья и головня	0,15
Сорго, чумиза	Спорынья и головня	0,1
Горох	Спорынья	0,1

ПРИЛОЖЕНИЕ И

ДОПУСТИМЫЕ УРОВНИ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ И ТОКСИКОГЕННЫХ ГРИБОВ В КОРМАХ И КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ (Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов (Утв. постановлением МСХ и П РБ №10 от 10 февраля 2011 г.))

Корма	Контролируемые показатели	Значение
<i>Зерно, поставляемое на кормовые цели</i>		
Злаковые (пшеница, ячмень, овес, рожь, тритикале, просо, сорго, кукуруза)	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,05
	Г-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	1,0
	Зеараленон	1,0
	Фумонизин	5,0 (кукуруза)
	Сумма афлатоксинов В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂	0,02
Масличные (соя, рапс, подсолнечник)	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,05
	Г-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	1,0
	Зеараленон	1,0
Зернобобовые (горох, люпин, кормовые бобы, вика, чечевица, чина)	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,05
	Г-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	1,0
	Зеараленон	1,0
	Сумма афлатоксинов В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂	0,02
<i>Комбикорма полнораціонные, кормосмеси и др.</i>		
Для сельскохозяйственной птицы	Содержание спорыньи	Не допускается
	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02 (0,01*)
	Охратоксин А	0,05 (0,01*)
	Г-2 токсин	0,1 (0,05*)
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	1,0 (0,7*)
	Зеараленон	2,0 (1,0*)
	Фумонизин В ₁ (с содержанием кукурузы)	5,0
	Содержание гриба <i>Aspergillus fumigatus</i> : диаспор/г, не более	1 × 10 ³ *
* Цыплята до 90 дней, бройлеры до 30 дней, утята до 55 дней, гусята до 65 дней, индюшата до 60 дней и куры-несушки		

Корма	Контролируемые показатели	Значение
Для свиней	Содержание спорыньи	Не допускается
	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,05 (0,01*)
	Охратоксин А	0,05 (0,01*)
	Т-2 токсин	0,1 (0,05*)
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	1,0 (0,25*)
	Зеараленон	1,0 (0,2*)
	Фумонизин В ₁ (с содержанием кукурузы)	5,0
* Поросята до 4 месяцев, супоросные и подсосные свиноматки		
Для пушных зверей (лисиц, песцов, соболей, норок), кроликов и нутрий	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02 (0,01*)
	Охратоксин А	0,05 (0,01*)
	Т-2 токсин	0,1 (0,05*)
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	2,0 (1,0*)
	Зеараленон	1,0 (0,2*)
* Для молодняка и взрослых зверей в период беременности и лактации		
Для прудовых рыб	Содержание спорыньи	Не допускается
	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
		0,005 (для форели)
		0,01 (сеголетки)
	Т-2 токсин	0,15
		0,1 (сеголетки карпа)
	Дезоксиниваленол	2,0
		1,0 (сеголетки карпа)
	Охратоксин	0,05
0,02 (сеголетки карпа)		
<i>Комбикорма-концентраты, кормосмеси и др.</i>		
Для крупного рогатого скота	Содержание спорыньи, %, не более:	
	для откорма	0,1
	для остальных групп	не допускается
	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,1
	Т-2 токсин	0,4
		0,1 (дойные коровы и телята до 6 месяцев)
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	2,0
		1,0 (дойные коровы и телята до 6 месяцев)
	Зеараленон	2,0
1,0 (дойные коровы и телята до 6 месяцев)		

Корма	Контролируемые показатели	Значение
Для овец, коз	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,05
	Т-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	2,0
	Зеараленон	1,0
Для лошадей	Содержание спорыньи, головни	
	Не допускается	
	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,05
	Т-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	2,0
	Зеараленон	1,0
Фумонизин В ₁ (с содержанием кукурузы)	2,0	
<i>Сухие корма для непродуктивных животных</i>		
Для собак, кошек, декоративных птиц, аквариумных рыбок	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более	
	Афлатоксин В ₁	0,01 (0,005*)
	Т-2 токсин	0,1 (0,1*)
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	2,0 (1,0*)
* Для молодняка до 6 месяцев		
<i>Сырье для производства комбикормов и кормовые добавки</i>		
Отруби, мука кормовая, дерть и др.	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,02
	Охратоксин А	0,05
	Т-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	2,0
	Зеараленон	1,0
Жмыхи и шроты	Содержание микотоксинов, мг/кг, не более:	
	Афлатоксин В ₁	0,05
	Охратоксин А	0,05
	Т-2 токсин	0,1
	Дезоксиниваленол (вомитоксин)	1,0
	Зеараленон	1,0
	Фумонизин	2,5 (шрот и жмых кукурузный, мука кукурузная)
Зернокартофельная барда (сухая), меласная барда (сухая) и др.	Содержание микотоксинов:	
	Т-2 токсин	0,1
	Охратоксин А	0,05

**ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ УРОВНИ СОДЕРЖАНИЯ ВРЕДНЫХ
ПРИМЕСЕЙ В ЗЕРНЕ, ПОСТАВЛЯЕМОМ НА КОРМОВЫЕ ЦЕЛИ**

Наименование показателя	Допустимый уровень, %, не более	Наименование зерна
Спорынья и головня (по со- вокупности)	0,1	Пшеница, ячмень, овес, рожь, просо, сорго, тритикале
	0,15	Кукуруза
Головневые зерна (мараные, синегузочные)	10,0	Пшеница, тритикале
Фузариозные зерна	1,0	Пшеница, ячмень, рожь, тритикале

СХЕМА МИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ

- 1-й день:**
- приготовление экстрактов из присланных образцов кормов;
 - органолептический анализ;
 - микроскопическое исследование соскобов или смывов из проб кормов;
 - посевы в бактериологические чашки, во влажные камеры (чашки с посевами помещают в термостат);
 - начинают скормливать животным выделенный для этих целей исследуемый корм;
 - приготовление экстракта для пробы на кролике.
- 2-й день:**
- готовый экстракт наносят на выбритую кожу кролика.
- 3-й день:**
- вторично наносят экстракт на кожу кролика;
 - чашки вынимают из термостата и рассматривают посевы невооруженным глазом.
- 4-й день:**
- учитывают кожную реакцию.
- 5-й день:**
- просматривают посевы в чашках, учитывают выросшие колонии;
 - при наличии спороношения определяют вид;
 - пересевают на агар Чапека в пробирках и ставят в термостат до появления спороношения;
 - для определения видов грибов рода *Fusarium* колонии пересевают для спороношения на декстрозно-картофельный агар или сусло-агар, а также на рисовый агар для пигментообразования.
- 7-й день:**
- просматривают чашки с первичными посевами.
- 8-й день:**
- просматривают чашки с первичными посевами.

- 9-10-й день:**
- просматривают чашки с первичными посевами;
 - при появлении запоздалых колоний на зерне их также пересевают на агар Чапека в пробирках для дальнейших работ;
 - производят окончательный учет выросших колоний грибов;
 - определение степени заражения образцов кормов производят ориентировочно, выводя процентное отношение выросших колоний каждого гриба к общему числу посеянных зерен, кусочков соломы, сена или кусочков мучнистых кормов или производят посев на пластинчатый агар смыва с 1 г корма в последовательных разведениях (1:1000, 1:10000 и т.д.) и затем делают расчет обсемененности;
 - споровой взвесью (из выросших колоний на агаре Чапека, засеянных на 5-й день) заражают приготовленные растительные среды, ставят в термостат при температуре +20...+25°C и выдерживают до полного развития спороношения; сосуды из термостата вынимают и оставляют при комнатной температуре еще на 5 суток.

- 20-й день:**
- проверяют токсичность выделенных культур.

В зависимости от особенностей случая указанные сроки исследования могут сокращаться (при выделении *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus fumigatus*) или удлиняться (при выделении *Stachybotrys alternans*).

Важно изучать культуру с первых дней ее появления и дальнейшего развития (спороношения), а также своевременно выявлять загрязнение.

Учебное издание

Кошнеров Андрей Геннадьевич,
Красочко Ирина Александровна,
Кирпанёва Елена Анатольевна и др.

**МИКОЛОГИЯ С МИКОТОКСИКОЛОГИЕЙ.
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОТОКСИКОЗОВ**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск А. Г. Кошнеров
Технический редактор Е. А. Алисейко
Компьютерный набор Е. А. Капанова
Компьютерная верстка Е. В. Морозова
Корректор Е. В. Морозова

Подписано в печать 18.12.2023. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Усл. п. л. 5,50. Уч.-изд. л. 4,41. Тираж 100 экз. Заказ № 2443.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 48-17-82.
E-mail: rio@vsavm.by
<http://www.vsavm.by>